

NICOLLE LOUISE FERREIRA BARROS

PROTEÍNA MeLEA3 DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz): ESTUDOS
DE RESPOSTA A ESTRESSES ABIÓTICOS POR MEIO DE EXPRESSÃO
HETERÓLOGA EM *Escherichia coli*

BELÉM

2017

NICOLLE LOUISE FERREIRA BARROS

PROTEÍNA MeLEA3 DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz): ESTUDOS
DE RESPOSTA A ESTRESSES ABIÓTICOS POR MEIO DE EXPRESSÃO
HETERÓLOGA EM *Escherichia coli*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências
Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cláudia Regina Batista de
Souza. Laboratório de Biologia Molecular – ICB
– UFPA

BELÉM

2017

NICOLLE LOUISE FERREIRA BARROS

PROTEÍNA MeLEA3 DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz): ESTUDOS
DE RESPOSTA A ESTRESSES ABIÓTICOS POR MEIO DE EXPRESSÃO
HETERÓLOGA EM *Escherichia coli*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências
Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cláudia Regina Batista de Souza
Laboratório de Biologia Molecular, UFPA

Avaliadora: Prof.^a MSc. Aline Medeiros Lima
Campus de Tomé-Açu, UFRA

Avaliadora: Dr.^a Carinne de Nazaré Monteiro Costa
Laboratório de Evolução e Desenvolvimento de Vertebrados, UFPA

BELÉM

2017

“Sei que o meu trabalho é uma gota no oceano,
mas sem ele, o oceano seria menor.”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará (UFPA) e Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e aos órgãos financiadores como o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por tornarem esse trabalho possível.

Notadamente, agradeço ao time de Genética Vegetal do Laboratório de Biologia Molecular do ICB-UFPA pelo clima amistoso que torna o ambiente harmônico para o desenvolvimento da pesquisa científica, pela ajuda com os experimentos e câmbio de experiências. Em especial, à minha orientadora Dr.^a Cláudia Regina, meu exemplo de profissional bem-sucedida e inteligente. Obrigada por ser o oposto da maioria dos orientadores e realmente guiar seus alunos. Obrigada por, algumas vezes, ficar aos sábados ou até 22 h prestando auxílio quanto as atividades.

Obrigada aos autores que, previamente, publicaram informações que ampararam esse trabalho, principalmente àqueles do nosso grupo de pesquisa que estabeleceram a linha do tempo que resultou nos objetivos do presente estudo.

Aos laboratórios e pesquisadores colaboradores.

Meu eterno agradecimento a Deus por zelar por mim e oferecer motivos para que eu continue sempre agradecendo à Ele.

Agradeço aos meus pais pelo amor por mim antes mesmo da minha existência e por exteriorizarem tal sentimento nas mais diminutas atitudes cotidianas. Obrigada, mãe, por tornar seus os meus objetivos e contribuir com muito de si dia-a-dia para o êxito. Obrigada, pai, por não hesitar em fazer-se presente em minha vida, ainda que não moremos juntos. Vocês são minha bússola moral, parceiros de luta e representam a real finalidade de toda minha caminhada.

Agradeço à minha família, especialmente àqueles que me auxiliaram das mais variadas formas ou àqueles que, silenciosamente, torcem por mim. Sobretudo, agradeço aos meus avós Antônio (*in memoriam*), Isaura (*in memoriam*), Maria do Carmo (*in memoriam*) e Olivaldo, por terem repassado aos meus pais virtudes inestimáveis que chegaram até a mim.

Aos meus amigos, meu sentimento de gratidão pelos momentos de descontração, pelas conversas reflexivas e desabafos, pelo carinho e confiança ao permitirem que eu participe dos seus momentos conhecendo suas famílias. Ao meu cachorro, que veio para aliviar um período

turbulento, por ser companheiro desde minha infância e parte da alegria em meio aos estresses rotineiros.

Obrigada aos que direta e/ou indiretamente participaram ou participam dessa trajetória.

Às plantas, por cederem seu material genético.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	v
Apresentação	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
Introdução	1
Material e Métodos	4
Resultados e discussão	7
Produção da proteína MeLEA3 recombinante por expressão heteróloga em bactérias	7
Proteção às células bacterianas contra estresse abiótico é conferida pela MeLEA3	9
Proteção contra a inativação térmica da enzima de restrição <i>NdeI</i> pela MeLEA3	12
Referências	15
Apêndice A	19
Anexo A	26

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA – *complementary deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico complementar)

ERD – *early responsive to dehydration* (resposta rápida à desidratação)

IPTG - *Isopropyl- β - D - thiogalactoside* (isopropil- β – D - tiogalactosídeo)

LEA - *late embryogenesis abundant* (abundantes na embriogênese tardia)

ORF – *open reading frame* (matriz aberta de leitura)

PBS - *phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

PCR - *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

RT – PCR – *reverse transcription - polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa)

SDS - *sodium dodecyl sulfate* (sulfato dodecil de sódio)

SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida - Sulfato dodecil de sódio)

APRESENTAÇÃO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso é uma reprodução do artigo **Heterologous Expression of MeLEA3: A 10 kDa Late Embryogenesis Abundant Protein of Cassava, Confers Tolerance to Abiotic Stress in *Escherichia coli* with Recombinant Protein Showing *In Vitro* Chaperone Activity**, de Barros et al. (2015), volume vinte e dois. Sob o tema Ciência de Proteínas e Peptídeos e baseado na expressão recombinante, foi publicado no periódico *Protein & Peptide Letters* pela *Bentham Science*, com DOI 10.2174/0929866522666150520145302. Para ter acesso ao artigo e à normatização da redação desse, vide o **apêndice A** e o **anexo A** deste documento, respectivamente.

RESUMO

Proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA, de *Late Embryogenesis Abundant*) possuem baixo peso molecular e estão envolvidas na aquisição de tolerância a seca, salinidade, altas temperaturas, frio e congelamento, em diversas plantas. Estudos preliminares revelaram uma sequência de cDNA codificando a proteína LEA atípica de 10 kDa, denominada MeLEA3, predita para ter localização mitocondrial e com potencial envolvimento na resposta ao estresse salino em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Desta forma, o principal objetivo do presente trabalho foi produzir a proteína MeLEA3 recombinante por meio da expressão heteróloga em *Escherichia coli*, e avaliar a tolerância das bactérias expressando essa proteína sob estresse abiótico. Nossos resultados indicaram que a proteína recombinante conferiu função protetora frente aos estresses térmico e salino em células bacterianas. Também, a MeLEA3 recombinante demonstrou atividade de chaperona *in vitro* mediante proteção da atividade da enzima de restrição *NdeI* sob estresse térmico.

Palavras-chave: Estresse abiótico, Proteína LEA atípica, Mandioca, Atividade de chaperona, Expressão heteróloga em bactérias, Proteína recombinante.

ABSTRACT

Late embryogenesis abundant (LEA) proteins are small molecular weight proteins involved in acquisition of tolerance to drought, salinity, high temperature, cold, and freezing stress in many plants. Previous studies revealed a cDNA sequence coding for a 10 kDa atypical LEA protein, named MeLEA3, predicted to be located into mitochondria with potential role in salt stress response of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Here we aimed to produce the recombinant MeLEA3 protein by heterologous expression in *Escherichia coli* and evaluate the tolerance of bacteria expressing this protein under abiotic stress. Our result revealed that the recombinant MeLEA3 protein conferred a protective function against heat and salt stress in bacterial cells. Also, the recombinant MeLEA3 protein showed *in vitro* chaperone activity by protection of *NdeI* restriction enzyme activity under heat stress.

Keywords: Abiotic stress, Atypical LEA protein, Cassava, Chaperone activity, Heterologous expression in bacteria, Recombinant protein.

Proteína MeLEA3 de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): estudos de resposta a estresses abióticos por meio de expressão heteróloga em *Escherichia coli*

Nicolle L. F. Barros^{1,2}, Diehgo T. da Silva^{1,3}, Deyvid N. Marques^{1,4}, Fabiano M. de Brito^{1,5}, Sávio P. dos Reis^{1,4} e Cláudia R. B. de Souza^{1,*}

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA, 66075-110. ²Bolsista de Iniciação Científica-PIBIC-UFPA/CNPq, Belém, PA, Brasil, 66075-110. ³Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular-UFPA, Belém, PA, Brasil, 66075-110. ⁴Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular-UFPA, Belém, PA, Brasil, 66075-110. ⁵Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil, 66077-530

* Endereço para correspondência a este autor no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 66075-110, Brasil; Tel/Fax: 55 (91) 3201-7585; E-mail: bsouza@ufpa.br

INTRODUÇÃO

O crescimento e o desenvolvimento de plantas podem ser afetados por múltiplos fatores abióticos, tais como extremos de temperatura e pH, elevada salinidade e seca, ocasionando perdas significativas à produção de culturas mundialmente.

Em nível molecular, sabe-se que as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de respostas adaptativas às alterações ambientais por meio da regulação de vários genes relacionados à defesa abiótica. Entre esses, as proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA), a princípio identificadas durante estágios tardios de desenvolvimento das sementes de algodão, acompanhadas de desidratação [1-3], possuem baixo peso molecular variando entre 10 a 30 kDa [4] e estão envolvidas na aquisição de tolerância à seca, alta temperatura, salinidade, frio e congelamento, em diferentes plantas [5,6]. Em animais, proteínas LEA foram detectadas em rotíferos [7] e nematódeos, como *Aphelenchus avenae* [8] e *Caenorhabditis elegans* [9]. As proteínas LEA podem ser encontradas também em microrganismos, a exemplo de *Bacillus subtilis* [10].

As proteínas LEA foram inicialmente classificadas por Dure *et al.* [11] em seis grupos, de acordo com a ocorrência de motivos de aminoácidos conservados. A partir dos avanços na identificação de novas proteínas LEA, outras classificações foram propostas [12-14], incluindo a de Jaspard *et al.* [14], a qual é baseada em propriedades físico-químicas e resulta na distribuição de proteínas LEA em doze grupos. Ademais, considerando-se sua natureza bioquímica, essas proteínas podem ser classificadas como LEA típicas, quando são altamente hidrofílicas [5,15], enquanto aquelas que apresentam características hidrofóbicas são conhecidas como LEA atípicas [16-22]. Para mais detalhes acerca das principais classificações das proteínas LEA, consultar a revisão de Amara *et al.* [23].

Sabe-se que proteínas LEA podem participar de diversos mecanismos para assegurar a manutenção de processos biológicos vitais durante o estresse abiótico. Assim, elas podem proteger outras proteínas e/ou componentes celulares da agregação ou dessecação via retenção de água, sequestro de íons, além de atuarem molecularmente como chaperonas, como no caso das proteínas altamente hidrofílicas ERD10 e ERD14 de *Arabidopsis thaliana* [24]. Do mesmo modo, as proteínas LEA podem interagir com membranas mitocondriais a fim de preservar os lipossomos expostos à seca, como a PsLEAm, uma LEA hidrofílica mitocondrial de ervilha (*Pisum sativum*) [25]. Além disso, estudos evidenciaram deidrininas de *Citrus unshiu* com habilidade de estabilizar enzimas lábeis em condições de estresse térmico por frio [26,27], de funcionar como antioxidante na defesa de mitocôndrias contra baixas temperaturas ou de reduzir o dano oxidativo causado pelo estresse hídrico [28,29]. Em *Medicago truncatula*, uma LEA atípica denominada MtPM25 não foi capaz de conservar membranas, mas preveniu a agregação de proteínas durante o estresse [30].

A detecção de proteínas LEA e seus genes correspondentes é relevante para compreender como as plantas respondem e se ambientam, em nível molecular, às distintas perturbações abióticas como seca, frio e salinidade. Além disto, genes LEA têm sido utilizados com êxito na produção de culturas tolerantes às alterações ambientais por programas de melhoramento molecular [31,32]. Portanto, a respeito das características agrônômicas, o isolamento e caracterização de genes e proteínas LEA contribuem para o melhoramento genético visando promover a aquisição ou aperfeiçoamento da tolerância aos estresses abióticos em culturas relevantes.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das culturas alimentícias tropicais mais importantes para mais de oitocentos milhões de pessoas no mundo. É uma espécie cultivada principalmente em países tropicais em desenvolvimento, onde a raiz é a principal

fonte de calorias para indivíduos de baixa renda devido à alta produtividade e resistência aos fatores abióticos.

A identificação de sequências referentes as LEA de mandioca foi relatada pela primeira vez por Souza *et al.* [33], que isolaram uma sequência parcial de cDNA codificando uma proteína LEA putativa, possivelmente relacionada à tuberização de raízes de armazenamento. Posteriormente, Costa *et al.* [34] caracterizaram a sequência completa de cDNA codificando uma proteína LEA atípica de 10 kDa, denominada MeLEA3, apresentando o domínio conservado Pfam PF03242 e pertencendo à família LEA3, conforme a classificação de Hundermark e Hinch [13]. Ademais, o acúmulo de transcritos de MeLEA3 foi potencializado em folhas de mandioca tratadas com cloreto de sódio, com expressão máxima em 8 horas, sugerindo provável envolvimento na resposta ao estresse salino [34]; no entanto, as funções moleculares desta proteína ainda são desconhecidas. Por outro lado, vários estudos demonstram o uso eficiente de *Escherichia coli* para análises funcionais *in vivo* de proteínas LEA de plantas [22, 35-39].

Desta forma, neste trabalho objetivamos produzir a MeLEA3 recombinante por meio da expressão heteróloga em *E. coli* e avaliar a tolerância das bactérias expressando essa proteína quando submetidas ao estresse salino e térmico. Além disto, a atividade de chaperona da MeLEA3 recombinante também foi avaliada.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho de iniciadores e predição da solubilidade da MeLEA3 recombinante

Para o desenho de iniciadores e predição da solubilidade da MeLEA3 recombinante expressa em *E. coli*, foram utilizadas as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de MeLEA3 descritas por Costa *et al.* [34]. O iniciador senso MeLEA3-Ex-F1 (5'TGCATATGGCTCGCTCTTTCTCAGACG3') e o anti-senso MeLEA3-Ex-R1 (5'TACTCGAGATGCT TCTTCAACAGCATAGCCCT3') contendo sítios para *NdeI* e *XhoI* (bases sublinhadas), respectivamente, foram desenhados fazendo-se uso do programa *Vector NTI Advance 10* (Invitrogen, EUA). A solubilidade da proteína MeLEA3 recombinante foi predita a partir da análise de regressão logística (<http://www.biotech.ou.edu/>) baseada no modelo de predição proposto por Diaz *et al.* [40].

Clonagem, expressão e purificação da proteína MeLEA3 recombinante

A sequência de MeLEA3 foi clonada no vetor pET29a (Novagen, EUA) nos sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, gerando a construção pET29a-MeLEA3 com a proteína recombinante contendo a cauda 6×His C-terminal.

Inicialmente, a sequência referente a ORF de MeLEA3 foi amplificada por ensaios de PCR usando os iniciadores MeLEA3-Ex-F1 e MeLEA3-Ex-R1 e DNA molde da sequência completa de cDNA de MeLEA3 clonada no vetor *pGEM-T Easy* (Promega, EUA) por Costa *et al.* [34]. Em seguida, as amostras de DNA do vetor pET29a e da ORF de MeLEA3 foram digeridas separadamente com *NdeI* e *XhoI* (*New England Biolabs*, UK), purificadas a partir do gel de agarose com o kit *Zymoclean Gel DNA Recovery* (*Zymo Research Corporation*, EUA) e ligadas por meio da DNA ligase (*New England Biolabs*, UK). Células bacterianas de *E. coli* da estirpe Rosetta (Novagen, EUA) foram transformadas com a construção pET29a-MeLEA3 por eletroporação, e a expressão da proteína recombinante foi induzida por IPTG (1 mM), com incubação a 37°C por seis horas. Como controle negativo foram utilizadas células bacterianas transformadas com o vetor pET29a sem o inserto (pET29a vazio).

Para extração das proteínas totais, as células de *E. coli* foram sedimentadas por centrifugação a 10.000 rpm durante dez minutos, seguida de lavagem do sedimento com Tris

10 mM pH: 8,0, e ressuspensão em tampão fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; KCl 2,7 mM; pH: 7,4). A lise foi realizada por repetidos ciclos de congelamento e descongelamento. Após centrifugação a 12.000 rpm por dez minutos a 4°C, o sobrenadante contendo a proteína recombinante solúvel foi coletado e analisado em SDS-PAGE de acordo com Laemmli [41].

A proteína MeLEA3 recombinante contendo a cauda de histidina foi purificada por afinidade em coluna de níquel (NiTA-agarose, Novagen, EUA) utilizando-se tampão de eluição com 250 mM de imidazol (Dinâmica), em conformidade com as orientações do fabricante. Amostras da fração submetida à coluna e da MeLEA3 purificada foram separadas por SDS-PAGE para verificar a eficiência do processo de purificação. A amostra da MeLEA3 purificada foi quantificada no fluorímetro Qubit (Invitrogen, EUA).

Ensaio de estresse salino de bactérias expressando a proteína MeLEA3 recombinante

Para ensaios de tolerância ao estresse salino, células bacterianas contendo a construção pET29a-MeLEA3 foram cultivadas em meio LB contendo IPTG (1 mM) e diferentes concentrações de NaCl (0, 250, 500 e 750 mM), segundo o procedimento descrito por Reddy *et al.* [35] e Santa Brígida *et al.* [42]. Como controle negativo foram utilizadas bactérias transformadas com o vetor pET29a sem inserto. O crescimento bacteriano foi monitorado por medidas de absorbância a 600 nm. Os ensaios foram reproduzidos ao menos cinco vezes, e para cada tratamento foram feitas três repetições.

Ensaio de estresse térmico de bactérias expressando a proteína MeLEA3 recombinante

Para ensaios de tolerância ao estresse térmico, células bacterianas com a construção pET29a-MeLEA3 foram cultivadas em meio LB contendo IPTG (1 mM) e expostas à distintas temperaturas (37°C, 45°C e 50°C), de acordo com o procedimento descrito por Reddy *et al.* [35]. Após incubação sob múltiplas temperaturas, o crescimento bacteriano foi monitorado por medidas de absorbância a 600 nm. Os ensaios foram reproduzidos ao menos cinco vezes. Para cada tratamento foram realizadas três repetições. Como controle negativo foram utilizadas bactérias transformadas com o vetor pET29a sem inserto.

Atividade de chaperona *in vitro* da proteína MeLEA3 recombinante

Ensaio de atividade de chaperona foram realizados de acordo com metodologia descrita por Hess & FitzGerald [43], com algumas modificações. A atividade enzimática de *NdeI* foi avaliada por meio da clivagem do vetor de DNA pGEM-3Z (Promega, EUA), com um único sítio para essa enzima de restrição. O DNA plasmidial foi preparado por lise alcalina com SDS de acordo com Birnboim & Doly [44].

Amostras de DNA do vetor pGEM-3Z foram digeridas com *NdeI* a 50°C durante trinta minutos na presença ou ausência da MeLEA3 recombinante (2,0 µg). Como controle foi utilizado o DNA plasmidial digerido com *NdeI* a 37°C por trinta minutos. Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, incluindo o DNA plasmidial não digerido. Os ensaios foram repetidos ao menos cinco vezes e para cada tratamento foram desenvolvidas três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção da proteína MeLEA3 recombinante por expressão heteróloga em bactérias

Fatores abióticos, tais como extremos de temperatura e pH, alta salinidade e seca, causam prejuízos significativos à produção de culturas em todo o mundo. Em contrapartida, proteínas LEA e os genes referentes a elas têm sido empregados com sucesso na geração de culturas geneticamente modificadas com tolerância às perturbações abióticas [31,32]. Assim, o isolamento e caracterização dessas proteínas colaboram para a compreensão dos mecanismos por meio dos quais as plantas respondem e se adaptam aos estresses ambientais, bem como para o melhoramento molecular de culturas de importância agrícola.

Em mandioca, foi identificada uma sequência de cDNA codificando a proteína de 10 kDa MeLEA3, cujos níveis de transcritos aumentaram em folhas durante tratamento *in vitro* com cloreto de sódio [34]; todavia as funções desta proteína ainda são desconhecidas. Conseqüentemente, o principal objetivo do presente trabalho foi produzir a proteína MeLEA3 recombinante via expressão heteróloga em *E. coli* e avaliar se essa proteína poderia proteger *in vivo* as células bacterianas durante estresses abióticos.

Para isto, primeiro foi avaliado se a MeLEA3 poderia ser expressa em *E. coli* como proteína solúvel, já que proteínas insolúveis produzidas como corpos de inclusão frequentemente exigem protocolos trabalhosos para extração e solubilização proteicas. Sendo assim, a sequência de aminoácidos da MeLEA3 foi submetida à análise de regressão logística segundo o estudo de Diaz *et al.* [40], no qual múltiplos parâmetros para predição da solubilidade da proteína em *E. coli* foram considerados, tais como peso molecular e maior número de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos contíguos. A análise revelou 100% de probabilidade de solubilidade para MeLEA3 quando super-expressa em *E. coli*, o que foi validado experimentalmente mediante visualização da banda correspondente a esta proteína no extrato proteico total de células bacterianas expressando pET29a-MeLEA3 (Fig. 1A), obtido de acordo com o descrito no Material e Métodos.

Na Fig. 1A é mostrada a SDS-PAGE de proteínas totais de células bacterianas transformadas com a construção pET29a-MeLEA3 e o pET29a sem inserto, usado como controle negativo, após indução com IPTG (1 mM) e incubação a 37°C por seis horas. A amostra pET29a-MeLEA3 apresentou uma banda adicional e intensa com cerca de 10 kDa, a qual não foi observada na amostra controle (CTRL-) (Fig. 1A). Os resultados também indicaram que a proteína recombinante MeLEA3 contendo a cauda 6×His C-terminal foi

purificada com sucesso através da coluna de níquel, como mostrado na Fig. **1B**, onde as amostras da fração submetida à coluna e da MeLEA3 purificada foram comparadas às proteínas totais de células expressando pET29a-MeLEA3.

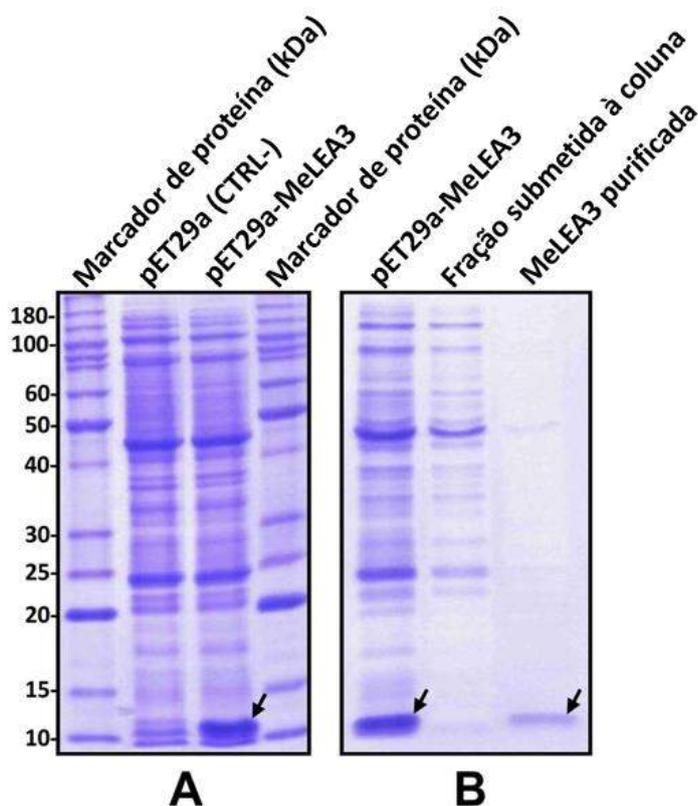


Figura 1. SDS-PAGE das amostras de proteínas totais de células bacterianas expressando a construção pET29a-MeLEA3 e o vetor pET29a sem inserto (CTRL-) (A) e frações de proteínas da purificação da MeLEA3 recombinante usando a coluna NiTA-agarose (B). As setas apontam para a proteína MeLEA3 de 10 kDa. Adaptado de: Barros et al. (2015).

A banda proteica de 10 kDa visualizada na SDS-PAGE está de acordo com o peso molecular de MeLEA3 predito por Costa *et al.* [34]. A MeLEA3 também foi predita para ser sintetizada como precursor contendo uma pré-sequência N-terminal de 46 aminoácidos que provavelmente é clivada após importação da proteína para a mitocôndria, resultando em uma proteína madura de 5 kDa [34]. Sabe-se que proteínas LEA possuem baixo peso molecular, com possível localização no citoplasma e em organelas, como núcleo, mitocôndria e cloroplasto. Em *Arabidopsis thaliana*, foram detectados 13 genes de LEA, codificando principalmente proteínas LEA3 e LEA4 com localização predita em cloroplasto/mitocôndria [13]. Em *Prosopis juliflora*, uma LEA atípica de 10 kDa, denominada PjLEA3, com localização predita em cloroplasto/mitocôndria, exibiu potencial participação na resposta à desidratação

[20]. Entre as funções das proteínas LEA mitocondriais está a defesa da membrana [25] e das enzimas da matriz mitocondrial, tais como fumarase e rodanase, durante dessecação [45].

Proteção às células bacterianas contra estresse abiótico é conferida pela proteína MeLEA3 recombinante

Nossos estudos prévios evidenciaram que a MeLEA3 é uma proteína LEA atípica, com um padrão ligeiramente hidropático e com a sequência amino-terminal mais hidrofóbica quando comparada à carboxi-terminal. Além disso, esses estudos atribuíram à MeLEA3 possível função na resposta ao estresse salino em mandioca, conforme análise de expressão gênica por meio de ensaios de RT-PCR semiquantitativa [34].

Ainda que a maioria dos estudos funcionais sobre proteínas LEA sejam voltados para as típicas hidrofílicas, algumas investigações mostram a participação de proteínas LEA atípicas na tolerância aos estresses abióticos. Essas incluem análises funcionais de LEA atípicas em plantas transgênicas [21,22] e expressão heteróloga em bactérias [22,36] e levedura [21]. Portanto, para testar se a MeLEA3 recombinante poderia contribuir para tolerância de células bacterianas a estresses abióticos, foi analisado o crescimento de células de *E. coli* expressando pET29a-MeLEA3 sob tratamentos salino e térmico.

Para os ensaios de estresse salino, a MeLEA3 recombinante foi expressa em células de bactérias submetidas a distintas concentrações de NaCl (0, 250, 500 e 750 mM) por doze horas e o crescimento bacteriano monitorado pela absorbância a 600 nm. Como mostrado na Fig. 2, os resultados revelaram diferenças pouco significativas entre as taxas de crescimento das bactérias expressando a MeLEA3 recombinante e células bacterianas controle transformadas com pET29a, sob 0 ou 250 mM de NaCl. No entanto, sob tratamentos com alta concentração de sal (500 mM e 750 mM), as bactérias expressando a proteína recombinante apresentaram vantagens no crescimento em comparação às células controle, confirmando que a MeLEA3 contribuiu para a defesa de células de *E. coli* contra o estresse salino.

Esse resultado está em concordância com outros estudos sobre proteínas LEA atípicas e típicas. Por exemplo, a super-expressão de SiLEA14, uma LEA atípica de milho painço, contribuiu para o crescimento de *E. coli* sob estresse salino [22]. Do mesmo modo, a OsLEA5, uma LEA atípica hidrofóbica de *Oryza sativa*, foi capaz de proteger células bacterianas em condições de elevadas concentrações de sal [36]. Como exemplos de LEA típicas, a PgLEA de *Pennisetum glaucum* conferiu proteção contra a alta salinidade em células

bacterianas [35], enquanto a proteína PM2 de soja protegeu *E. coli* submetida a tratamentos com extremos de salinidade ou temperatura [38,39]. Desta forma, podemos concluir que os resultados obtidos no presente trabalho corroboraram os dados prévios de estresse salino *in vitro* em folhas de mandioca [34], indicando que a MeLEA3 pode também conferir proteção *in vivo* contra salinidade na planta de mandioca.

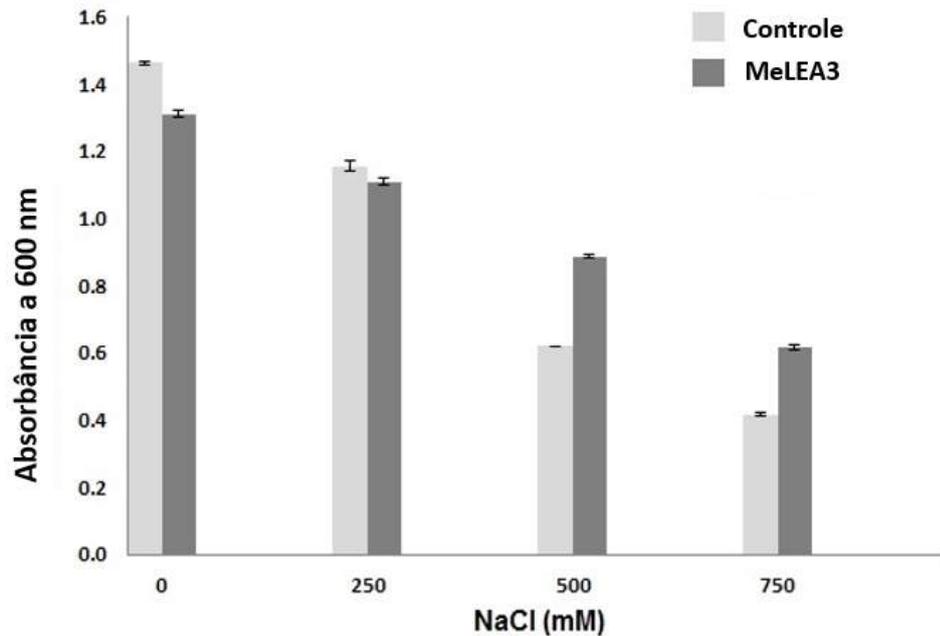


Figura 2. Avaliação do efeito da MeLEA3 recombinante no crescimento de *E. coli* sob estresse salino. Células bacterianas transformadas com pET29a-MeLEA3 foram submetidas à diferentes concentrações de NaCl (0, 250, 500 e 750 mM) com IPTG (1 mM) por doze horas, seguida de análise da absorvância a 600 nm. Células transformadas com o vetor pET29a foram utilizadas como controle. Adaptado de: Barros et al. (2015).

Além da defesa contra o estresse salino, também foi analisado o efeito da MeLEA3 recombinante no crescimento bacteriano durante o estresse térmico. Para isso, células de *E. coli* expressando a referida proteína foram submetidas a diferentes temperaturas (37°C, 45°C e 50°C) por doze horas, e o crescimento bacteriano foi monitorado por absorvância a 600 nm. Os resultados evidenciaram que, quando sob elevada temperatura (45°C e 50°C), as taxas de crescimento celular foram reduzidas, tanto nas bactérias expressando pET29a-MeLEA3 quanto naquelas apenas com pET29a em comparação ao crescimento a 37°C (Fig. 3), confirmando o efeito da alta temperatura na inibição do crescimento bacteriano. Os resultados também revelaram que a MeLEA3 contribuiu para tolerância das bactérias ao estresse térmico, uma vez

que, sob elevada temperatura, as células de *E. coli* expressando pET29a-MeLEA3 apresentaram melhor desempenho no crescimento em comparação com o controle (Fig. 3).

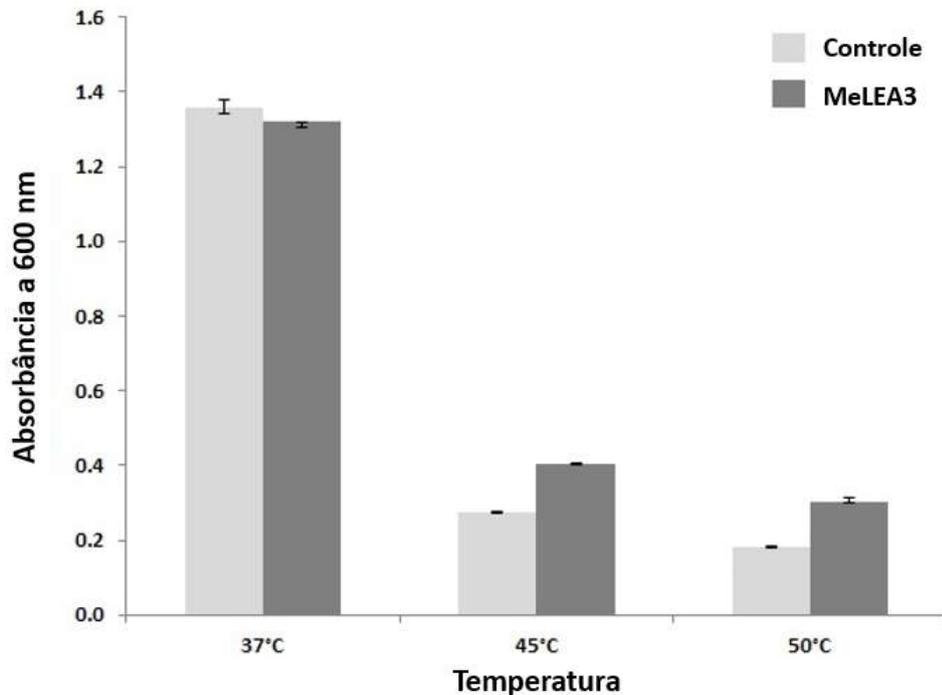


Figura 3. Avaliação do efeito da MeLEA3 recombinante no crescimento bacteriano sob estresse térmico. Células de *E. coli* transformadas com pET29a-MeLEA3 foram expostas à diferentes temperaturas (37°C, 45°C e 50°C) com IPTG (1 mM) por doze horas, seguida da análise de absorbância a 600 nm. Células transformadas com o vetor pET29a sem inserto foram utilizadas como controle. Adaptado de: Barros et al. (2015).

Esses resultados também estão em concordância com a literatura, onde outros estudos mostraram proteínas LEA conferindo tolerância contra temperaturas adversas em bactérias. Por exemplo, a expressão da proteína PM2 de soja protegeu *E. coli* diante de tratamentos com elevada temperatura [38, 39]. Similarmente, a pgLEA protegeu células bacterianas expostas ao estresse térmico [35]. Entre as funções protetoras das LEA contra estresses abióticos, é conhecido que elas podem agir como escudos moleculares reduzindo a agregação de proteínas sensíveis à desidratação [46-48]. Mais ainda, podem atuar como chaperonas ao interagirem com outras proteínas, estabilizando e preservando suas estruturas nativas e funções [24, 49, 50]. A atividade de chaperona das proteínas LEA pode envolver um mecanismo de antiagregação que evita a formação de agregados proteicos prejudiciais e estabiliza proteínas em um estado parcialmente desnaturado causado pelo estresse ambiental [24, 49, 50].

Proteção contra a inativação térmica da enzima de restrição *NdeI* pela MeLEA3

Baseado nos resultados de crescimento de bactérias expressando a MeLEA3 submetidas aos estresses salino e térmico, foi considerada a hipótese desta proteína atuar na tolerância ao estresse abiótico como chaperona molecular. Sendo assim, foram realizados ensaios de atividade de chaperona da MeLEA3 purificada, nos quais foi avaliado se essa proteína poderia proteger a enzima de restrição *NdeI* da inativação térmica. Amostras de DNA do vetor pGEM-3Z foram digeridas com *NdeI* a 50°C na presença ou ausência da MeLEA3 recombinante (2,0 µg), seguida de avaliação por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Os dados obtidos mostraram que a atividade da *NdeI* foi parcialmente inativada pela temperatura de 50°C em comparação com a amostra de DNA digerida a 37°C (Fig. 4). Ademais, a MeLEA3 conferiu função protetora a *NdeI* a 50°C, já que a amostra contendo essa proteína apresentou uma banda de DNA do plasmídeo linearizado mais intensa que a amostra sem MeLEA3, indicando uma melhor digestão do DNA pela *NdeI* quando na presença da proteína recombinante. Além disso, nossos resultados revelaram que o padrão de digestão da amostra com MeLEA3 estava similar ao da amostra controle com DNA do vetor digerido a 37°C, temperatura ótima para a atividade de *NdeI* (Fig. 4). Por isso, conclui-se que a MeLEA3 apresentou atividade de chaperona ao estabilizar e preservar a função da *NdeI* sob as condições de estresse térmico utilizadas no presente trabalho.

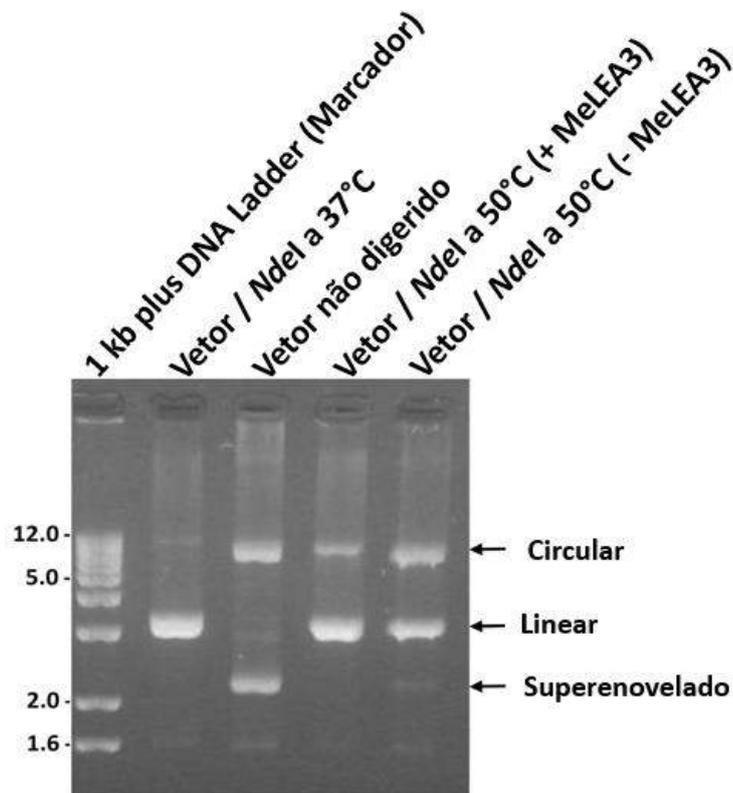


Figura 4. Ensaios de proteção contra inativação térmica da enzima de restrição *NdeI* pela MeLEA3 recombinante. Amostras de DNA do vetor pGEM-3Z foram digeridas pela *NdeI* a 50°C com ou sem a MeLEA3 e analisadas por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Amostras de DNA do vetor digerido por *NdeI* a 37°C e amostras de DNA do vetor não digerido foram utilizadas como controles. Adaptado de: Barros et al. (2015).

Nesse trabalho, foi reportada pela primeira vez a expressão heteróloga de uma proteína LEA de mandioca em *E. coli* e a avaliação da tolerância de bactérias expressando essa proteína sob estresses abióticos. Apesar dos objetivos não incluírem a elucidação dos mecanismos pelos quais a MeLEA3 recombinante protegeu as células bacterianas contra o estresse salino e térmico, é conhecido que proteínas LEA podem desempenhar mecanismos de defesa similares contra estresses abióticos tanto em células procarióticas quanto eucarióticas [10].

Adicionalmente, além de estudos funcionais sobre LEA atípicas de plantas em bactérias [22,36] e levedura [21], plantas transgênicas super-expressando tais genes confirmaram as funções das proteínas LEA no aumento da tolerância a estresses abióticos [21,22], sendo provável que a MeLEA3 tenha função semelhante na mandioca. Uma vez que a MeLEA3 presumivelmente apresenta localização na mitocôndria, é possível que essa proteína atue como chaperona molecular na defesa de proteínas e enzimas da matriz mitocondrial

expostas a estresses abióticos, como alta temperatura; entretanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer a exata função molecular da MeLEA3 em plantas de mandioca. Os dados obtidos no presente trabalho indicam o gene MeLEA3 como potencial candidato na geração de culturas geneticamente modificadas com resistência a estresses abióticos.

REFERÊNCIAS

- [1] Dure, L.III.; Greenway, S.C.; Galau, G.A. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 4162-4168.
- [2] Galau, G.A.; Hughes, D.W.; Dure, L.III. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.*, **1986**, *7*, 155-170.
- [3] Baker, J.; Steele, C.; Dure, L.III. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.*, **1988**, *11*, 277-291.
- [4] He, J.X.; Fu, J.R. Research progress in Lea proteins of seeds. *Plant Physiol. Commun.*, **1996**, *32*, 241-246.
- [5] Battaglia, M.; Olvera-Carrillo, Y.; Garcarrubio A.; Campos, F.; Covarrubias, A.A. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.*, **2008**, *148*, 6-24.
- [6] Battaglia, M.; Covarrubias, A.A. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Front. Plant Sci.*, **2013**, *4*, 190.
- [7] Denekamp, N.Y.; Reinhardt, R.; Kube, M.; Lubzens, E. Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in nondesiccated, encysted, and diapausing embryos of rotifers. *Biol. Reprod.*, **2010**, *82*, 714724.
- [8] Browne, J.A.; Dolan, K.M.; Tyson, T.; Goyal, K.; Tunnacliffe, A.; Burnell, A.M. Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryot. Cell*, **2004**, *3*, 966-975.
- [9] Gal, T.Z.; Glazer, I.; Koltai, H. An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Lett.*, **2004**, *577*, 21-26.
- [10] Stacy, R.A.; Aalen, R.B. Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late embryogenesis abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, **1998**, *206*, 476-478.
- [11] Dure, L.III.; Crouch, M.; Harada, J.; Ho, T-HD.; Mundy, J.; Quatrano, R.; Thomas, T.; Sung, Z.R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, **1989**, *12*, 475-486.
- [12] Tunnacliffe, A.; Wise, M.J. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, **2007**, *94*, 791-812.
- [13] Hundertmark, M.; Hinch, D.K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, **2008**, *9*, 118.

- [14] Jaspard, E.; Macherel, D.; Hunault, G. Computational and statistical analyses of amino acid usage and physico-chemical properties of the twelve late embryogenesis abundant protein classes. *PLoS ONE*, **2012**, *7*, e36968.
- [15] Wise, M.J.; Tunnacliffe, A. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci.*, **2004**, *9*, 13-17.
- [16] Galau, G.A.; Wang, H.Y.; Hughes, D.W. Cotton *lea5* and *lea14* encode atypical late embryogenesis-abundant proteins. *Plant Physiol.*, **1993**, *101*, 695-696.
- [17] Naot, D.; Ben-Hayyim, G.; Eshdat, Y.; Holland, D. Drought, heat and salt stress induce the expression of a citrus homologue of an atypical late-embryogenesis *Lea5* gene. *Plant Mol. Biol.*, **1995**, *27*, 619-622.
- [18] Zegzouti, H.; Jones, B.; Marty, C.; Lelièvre, J.M.; Latché, A.; Pech, J.C.; Bouzayen, M. ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Mol. Biol.*, **1997**, *35*, 847-854.
- [19] Kim, H.S.; Lee, J.H.; Kim, J.J.; Kim, C.H.; Jun, S.S.; Hong, Y.N. Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*. *Gene*, **2005**, *344*, 115-123.
- [20] George, S.; Usha, B.; Parida, A. Isolation and characterization of an atypical LEA protein coding cDNA and its promoter from drought tolerant plant *Prosopis juliflora*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2009**, *157*, 244-253.
- [21] Liu, Y.; Wang, L.; Jiang, S.; Pan, J.; Cai, G.; Li, D. Group 5 LEA protein, ZmLEA5C, enhance tolerance to osmotic and low temperature stresses in transgenic tobacco and yeast. *Plant Physiol. Biochem.*, **2014**, *84*, 22-31.
- [22] Wang, M.; Li, P.; Li, C.; Pan, Y.; Jiang, X.; Zhu, D.; Zhao, Q.; Yu, J. SiLEA14, a novel atypical LEA protein, confers abiotic stress resistance in foxtail millet. *BMC Plant Biol.*, **2014**, *14*, 290.
- [23] Amara, I.; Zaidi, I.; Masmoudi, K.; Ludevid, M. D.; Pagès, M.; Goday, A.; Brini, A. Insights into late embryogenesis abundant (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. *Am. J. Plant Sci.*, **2014**, *5*, 3440-3455.
- [24] Kovacs, D.; Kalmar, E.; Torok, Z.; Tompa, P. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol.*, **2008**, *147*, 381-390.
- [25] Tolleter, D.; Jaquinod, M.; Mangavel, C.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Manon, S.; Teyssier, E.; Payet, N.; Avelange-Macherel, M.H.; Macherel, D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell*, **2007**, *19*, 1580-1589.
- [26] Hara, M.; Terashima, S.; Kuboi, T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J. Plant Physiol.*, **2001**, *158*, 1333-1339.

- [27] Sanchez-Ballesta, M.T.; Rodrigo, M.J.; Lafuente, M.T.; Granell, A.; Zacarias, L. Dehydrin from Citrus, which confers in vitro dehydration to freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *J. Agric. Food. Chem.*, **2004**, *52*, 1950-1957.
- [28] Hara, M.; Terashima, S.; Fukaya, T.; Kuboi, T. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, **2003**, *217*, 290-298.
- [29] Hara, M.; Fujinaga, M.; Kuboi, T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiol. Biochem.*, **2004**, *42*, 657-662.
- [30] Boucher, V.; Buitink, J.; Lin, X.; Boudet, J.; Hoekstra, F.A.; Hundertmark, M.; Renard, D.; Leprince, O. MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. *Plant Cell Environ.*, **2010**, *33*, 418-430.
- [31] Xiao, B.; Huang, Y.; Tang, N.; Xiong, L. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor. Appl. Genet.*, **2007**, *115*, 35-46.
- [32] Sun, Y.; Chen, S.; Huang, H.; Jiang, J.; Bai, S.; Liu, G. Improved salt tolerance of *Populus davidiana* × *P. bolleana* overexpressed LEA from *Tamarix androssowii*. *J. For. Res.*, **2014**, *25*, 813-818.
- [33] de Souza, C.R.; Carvalho, L.J.; de Mattos Cascardo, J.C. Comparative gene expression study to identify genes possibly related to storage root formation in cassava. *Protein Pept. Lett.*, **2004**, *11*, 577-582.
- [34] Costa, C.N.M.; Santa Brígida, A.B.; Borges, B.N.; Menezes-Neto, M.A.; Carvalho, L.J.C.B.; de Souza, C.R.B. Levels of MeLEA3, a cDNA sequence coding for an atypical late embryogenesis abundant protein in cassava, increase under in vitro salt stress treatment. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **2011**, *29*, 997-1005.
- [35] Reddy, P.S.; Reddy, G.M.; Pandey, P.; Chandrasekhar, K.; Reddy, M.K. Cloning and molecular characterization of a gene encoding late embryogenesis abundant protein from *Pennisetum glaucum*: protection against abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.*, **2012**, *39*, 71637174.
- [36] He, S.; Tan, L.; Hu, Z.; Chen, G.; Wang, G.; Hu, T. Molecular characterization and functional analysis by heterologous expression in *E. coli* under diverse abiotic stresses for OsLEA5, the atypical hydrophobic LEA protein from *Oryza sativa* L. *Mol. Genet. Genomics*, **2012**, *287*, 39-54.
- [37] Lan, Y.; Cai, D.; Zheng, Y-Z. Expression in *Escherichia coli* of three different soybean late embryogenesis abundant (LEA) genes to investigate enhanced stress tolerance. *J. Integr. Plant Biol.*, **2005**, *47*, 613-621.
- [38] Liu, Y.; Zheng, Y.Z. PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *331*, 325-332.

- [39] Liu, Y.; Zheng, Y.; Zhang, Y.; Wang, W.; Li, R. Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of *Escherichia coli* and stabilization of enzyme activity under diverse stresses. *Curr. Microbiol.*, **2010**, *60*, 373-378.
- [40] Diaz, A.A.; Tomba, E.; Lennarson, R.; Richard, R.; Bagajewicz, M.J.; Harrison, R.G. Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biotechnol. Bioeng.*, **2010**, *105*, 374383.
- [41] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*, 680-685.
- [42] Santa Brígida, A.B.; dos Reis, S.P.; Costa, C.N.M.; Cardoso, C.M.; Lima, A.M.; de Souza, C.R. Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response. *Mol. Biol. Rep.*, **2014**, *41*, 1787-1797.
- [43] Hess, J.F.; FitzGerald, P.G. Protection of a restriction enzyme from heat inactivation by α -Crystallin. *Mol. Vis.*, **1998**, *4*, 29-32.
- [44] Birnboim, H.C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **1979**, *7*, 1513-1523.
- [45] Grelet, J.; Benamar, A.; Teyssier, E.; Avelange-Macherel, M-H.; Grunwald, D.; Macherel, D. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.*, **2005**, *137*, 157-167.
- [46] Chakrabortee, S.; Boschetti, C.; Walton, L.J.; Sarkar, S.; Rubinsztein, D.C.; Tunnacliffe, A. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **2007**, *104*, 18073-18078.
- [47] Chakrabortee S.; Tripathi, R.; Watson, M.; Schierle, G.S.; Kurniawan, D.P.; Kaminski, C.F.; Wise, M.J.; Tunnacliffe, A. Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Mol. Biosyst.*, **2012**, *8*, 210-219.
- [48] Hatanaka, R.; Hagiwara-Komoda, Y.; Furuki, T.; Kanamori, Y.; Fujita, M.; Cornette, R.; Sakurai, M.; Okuda, T.; Kikawada, T. An abundant LEA protein in the anhydrobiotic midge, PvLEA4, acts as a molecular shield by limiting growth of aggregating protein particles. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **2013**, *43*, 1055-1067.
- [49] Hartl, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **1996**, *381*, 571-580.
- [50] Hartl, F.U.; Hayer-Hartl, M. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2009**, *16*, 574-581.

APÊNDICE A – Artigo publicado de Barros et al. (2015)

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.se

Protein & Peptide Letters, 2015, 22, 689-695

689

Heterologous Expression of MeLEA3: A 10 kDa Late Embryogenesis Abundant Protein of Cassava, Confers Tolerance to Abiotic Stress in *Escherichia coli* with Recombinant Protein Showing *In Vitro* Chaperone Activity

Nicolle L.F. Barros^{1,2}, Diêlgo T. da Silva^{1,3}, Deyvid N. Marques^{1,4}, Fabiano M. de Brito^{1,5}, Sávio P. dos Reis^{1,4} and Cláudia R.B. de Souza^{1,*}

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA, 66075-110

²Bolsista de Iniciação Científica-PIBIC-UFPA/CNPq, Belém, PA, Brazil, 66075-110. ³Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular-UFPA, Belém, PA, Brazil, 66075-110.

⁴Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular-UFPA, Belém, PA, Brazil, 66075-110. ⁵Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brazil, 66077-530

Abstract: Late embryogenesis abundant (LEA) proteins are small molecular weight proteins involved in acquisition of tolerance to drought, salinity, high temperature, cold, and freezing stress in many plants. Previous studies revealed a cDNA sequence coding for a 10 kDa atypical LEA protein, named MeLEA3, predicted to be located into mitochondria with potential role in salt stress response of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Here we aimed to produce the recombinant MeLEA3 protein by heterologous expression in *Escherichia coli* and evaluate the tolerance of bacteria expressing this protein under abiotic stress. Our result revealed that the recombinant MeLEA3 protein conferred a protective function against heat and salt stress in bacterial cells. Also, the recombinant MeLEA3 protein showed *in vitro* chaperone activity by protection of NdeI restriction enzyme activity under heat stress.



C.R. Batista de Souza

Keywords: Abiotic stress, Atypical LEA protein, Cassava, Chaperone activity, Heterologous expression in bacteria, Recombinant protein.

INTRODUCTION

Growth and development of plants can be affected by several abiotic factors from environment, such as extremes of temperature and pH, high salinity and drought, causing significant losses to crop production worldwide.

At molecular level, it is known that plants have developed different mechanisms of response to adapt to stress by regulating the many genes involved in abiotic defense. Among them, late embryogenesis abundant (LEA) proteins, firstly identified during the late stage of seed development accompanied by dehydration in cotton [1-3], are small molecular weight proteins ranging from 10 to 30 kDa [4] involved in acquisition of tolerance to drought, high temperature, salinity, cold, and freezing stress in many plants [5,6]. In animals, LEA proteins were found in rotifers [7] and nematodes, such as *Aphelenchus avenae* [8] and *Caenorhabditis elegans* [9]. Also, LEA proteins can be found in microorganisms, such as *Bacillus subtilis* [10].

LEA proteins were firstly classified in six groups according to occurrence of conserved amino acid motifs by Dure *et al.* [11]. With advances on identification of new LEA proteins, other LEA classifications were reported [12-14], including a recent study of Jaspard *et al.* [14], who classified LEA proteins in twelve groups based on their physicochemical properties. In addition, taking into account their biochemical nature, LEA proteins can be classified as typical LEA, when they are very hydrophilic [5,15], while those containing hydrophobic characteristics are known as atypical LEA proteins [16-22]. For more details of main LEA protein classifications, see a review of Amara *et al.* [23].

It is known that LEA proteins can participate in several mechanisms to ensure the maintenance of vital biological processes under abiotic disturbances. LEA proteins can protect other proteins and/or component cellular from aggregation or desiccation by retaining water, sequestration of ions, and acting as molecular chaperones, such as the high hydrophilic ERD10 and ERD14 (for early response to dehydration) proteins of *Arabidopsis thaliana* [24]. Also, LEA protein can interact with mitochondrial membranes protecting the liposomes against drought, such as the PsLEAm, a hydrophilic mitochondrial LEA protein of pea (*Pisum sativum*) [25]. In addition, studies revealed dehydrins from *Citrus*

*Address correspondence to this author at the Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 66075-110, Brazil; Tel/Fax: 55 91 320 17583; E-mail: bsouza@ufpa.br

arabin with ability to stabilize labile enzymes under freezing conditions [26,27] and act as antioxidant in mitochondria in protection against low temperatures or reducing the oxidative damage caused by water stress [28,29]. In *Medicago truncatula*, an atypical LEA protein named MtPM25 was unable to protect membranes, but prevented aggregation of proteins during stress [30].

The identification of LEA proteins and their genes is important to understanding how plants respond and adapt themselves at molecular level to different abiotic stress, such as drought, cold and salinity. Furthermore, LEA genes have been successfully used in the production of stress-tolerance crops by molecular breeding programs [31,32]. Therefore, regarding agronomical traits, the isolation and characterization of LEA proteins and genes contribute to the genetic improvement of important crops aiming the acquisition or increasing of tolerance to abiotic stress.

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most important tropical foods crops for more than 800 million people in the world. This crop is cultivated mainly in developing countries of tropics, where its root is a principal source of calories for low-income people because of its high productivity and resistance to many abiotic factors.

The identification of LEA sequences of cassava was firstly reported by de Souza *et al.* [33], who isolated a partial cDNA sequence coding for a putative LEA protein possibly related to tuberization of the storage root. Later, Costa *et al.* [34] reported the characterization of this full-length cDNA sequence coding for a 10 kDa atypical LEA protein, named MeLEA3, showing the conserved domain Pfam PF03242 and belonging to LEA3 family, based on LEA protein classification of Hundermark and Hincha [13]. In addition, the accumulation of *MeLEA3* transcripts was increased in cassava leaves treated with sodium chloride, indicating a potential role in salt stress response [34]; however, we have no knowledge about MeLEA3 protein roles so far. Otherwise, studies have shown the efficient use of *Escherichia coli* for *in vivo* functional analysis of LEA proteins from plants [22, 35-39]. Therefore, in this work we aimed to produce the recombinant MeLEA3 protein by heterologous expression in *E. coli* and evaluate the tolerance of bacteria expressing this protein under salt and heat stresses. Also, the chaperone activity of recombinant MeLEA3 protein was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Primer Design and Prediction of Recombinant MeLEA3 Solubility

For primer design and prediction of recombinant MeLEA3 solubility expressed in *E. coli* the MeLEA3 nucleotide and amino acid sequences described by Costa *et al.* [34] were used. The forward primer MeLEA3-Ex-F1 (5'TGCATATGGCTCGCTCTTCTCAGACG3') and the reverse primer MeLEA3-Ex-R1 (5'TACTCGAGATGCTTCTTCAACAGCATAGCCCT3') containing sites for *Nde*I and *Xho*I (underlined bases), respectively, were designed using the Vector NTI Advance 10 Program (Invitrogen, USA). Solubility of recombinant MeLEA3 protein expressed in *E. coli* was predicted using logistic regression analysis

(<http://www.biotech.eu.edu/>) based on model for prediction reported by Diaz *et al.* [40].

Cloning, Expression and Purification of Recombinant MeLEA3 Protein

MeLEA3 sequence was cloned into the pET29a vector (Novagen, USA) at sites for *Nde*I and *Xho*I restriction enzymes, generating the pET29a-MeLEA3 construct with recombinant protein containing a C-terminal 6×His tag. First, the MeLEA3 ORF (open reading frame) sequence was amplified by PCR (polymerase chain reaction) assays using MeLEA3-Ex-F1 and MeLEA3-Ex-R1 primers and DNA template of MeLEA3 full-length cDNA cloned into pGEMT Easy Vector (Promega, USA) by Costa *et al.* [34]. Then, DNA samples of pET29a vector and MeLEA3 ORF were separately digested with *Nde*I and *Xho*I (New England Biolabs, UK), purified from an agarose gel using the ZymoClean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corporation, USA), and ligated by DNA ligase (New England Biolabs, UK). Bacteria cells of *E. coli* strain Rosetta (Novagen, USA) were transformed with pET29a-MeLEA3 construct by electroporation, and expression of recombinant protein was induced by Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) 1 mM and incubation at 37°C for 6 hours. As negative control we used bacteria cells transformed with an empty pET29a vector.

For extraction of total proteins, bacteria cells were collected by centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes, followed by pellet washing on 10 mM Tris pH8.0 and resuspension in phosphate buffered saline (PBS: NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, KCl 2.7 mM, pH: 7.4). Bacteria cells were disrupted by repeated cycles of freezing and thawing. After centrifugation at 12,000 rpm for 10 minutes at 4°C, the supernatant containing soluble recombinant protein was collected and analyzed on SDS-PAGE according to Laemmli [41].

MeLEA3 His-tagged recombinant protein was affinity purified by nickel column (NiTA-agarose, Novagen, USA) using elution buffer with 250 mM imidazole, according to manufacturer's instructions. Flow through fraction and purified MeLEA3 samples were separated by SDS-PAGE to verify the efficiency of purification process. Purified MeLEA3 sample was quantified using a Qubit fluorometer (Invitrogen, USA).

Salt Stress Assays of Bacteria Expressing the Recombinant MeLEA3 Protein

For assays of tolerance to salt stress, bacterial cells containing the pET29a-MeLEA3 construct were cultured in LB medium containing IPTG 1 mM and different NaCl concentrations (0, 250, 500 and 750 mM) according to procedure described by Reddy *et al.* [35] and Santa Brígida *et al.* [42]. As negative control we used bacteria cells transformed with an empty pET29a vector. Bacteria cells growth was monitored by absorbance at 600 nm. Assays were repeated at least five times. For each treatment were performed three repetitions.

Heat Stress Assays of Bacteria Expressing the Recombinant MeLEA3 Protein

For assays of tolerance to heat stress, bacterial cells containing the pET29a-MeLEA3 construct were cultured in LB medium containing IPTG 1 mM at different temperatures (37°C, 45°C and 50°C) according to procedure described by Reddy *et al.* [35]. After incubation at different temperatures, bacteria cells growth was monitored by absorbance at 600 nm. Assays were repeated at least five times. For each treatment were performed three repetitions. As negative control we used bacteria cells transformed with an empty pET29a vector.

In Vitro Chaperone Activity of Recombinant MeLEA3 Protein

Chaperone activity assays were performed according to procedure described by Hess & FitzGerald [43], with some modifications. Enzymatic activity of *Nde*I was assayed by cleavage of DNA pGEM-3Z vector (Promega, USA) containing an only one site for this restriction enzyme. Plasmid DNA was prepared by alkaline lysis with SDS according to Birnboim & Doly [44].

DNA samples of pGEM-3Z plasmid were digested with *Nde*I at 50°C for 30 minutes in the presence or absence of recombinant MeLEA3 (2.0 µg). As control sample, we used the plasmid DNA digested with *Nde*I at 37°C for 30 minutes. All samples were analyzed by agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide, including a plasmid DNA uncut. Assays were repeated at least five times, and for each treatment were performed three repetitions.

RESULTS AND DISCUSSION

Production of Recombinant MeLEA3 Protein by Heterologous Expression in Bacteria

Abiotic factors from environment, such as extremes of temperature and pH, high salinity and drought, have caused significant losses to crop production worldwide. On the other hand, LEA proteins and their genes have been successfully used to the generation of genetically engineered crops with tolerance to abiotic stress [31,32]. Thus, the isolation and characterization of such molecules contribute to understanding mechanism by which plants response and adapt themselves to abiotic stress, as well as to the molecular breeding of agriculturally important crops.

In cassava, a cDNA sequence coding for the 10 kDa MeLEA3 protein, with levels of transcripts increased in leaves during *in vitro* sodium chloride treatment was identified [34]; however, we have no knowledge about functions of MeLEA3 protein so far. Therefore, here our main goal was to produce the recombinant MeLEA3 protein by heterologous expression in *E. coli* and evaluate if this protein could protect *in vivo* bacteria cells against abiotic stress.

To achieve this goal, we firstly evaluated if the recombinant MeLEA3 protein could be expressed in *E. coli* as a soluble protein, since insoluble proteins produced as inclusions bodies frequently require laborious protocols for protein extraction and solubilization. Then, we submitted the

deduced amino acid sequence of MeLEA3 to logistic regression analysis according to study of Diaz *et al.* [40], where several parameters for predicting protein solubility in *E. coli* have been considered, such as molecular weight and largest number of contiguous hydrophobic and hydrophilic residues. Our analysis revealed 100.0 percent chance of solubility for MeLEA3 when over-expressed in *E. coli*, that was experimentally validated by detection of recombinant MeLEA3 protein from total protein of bacteria cells expressing the pET29a-MeLEA3 construct (Fig. 1A) obtained as procedure described in the *Material and Methods*.

In Fig. 1A is shown a SDS-PAGE of total protein from bacteria cells transformed with pET29a-MeLEA3 construct and an empty pET29a vector, used as negative control, after induction with IPTG 1 mM and incubation at 37°C for 6 hours. The pET29a-MeLEA3 sample showed an additional and intense band with about 10 kDa, which was not detected in the control sample (CTRL-) (Fig. 1A). Our results also revealed that the recombinant MeLEA3 protein containing a C-terminal 6-His was successfully purified by a nickel column, as shown in Fig. 1B, where the flow through fraction and purified MeLEA3 samples from the purification process were compared to the total protein of pET29a-MeLEA3 sample.

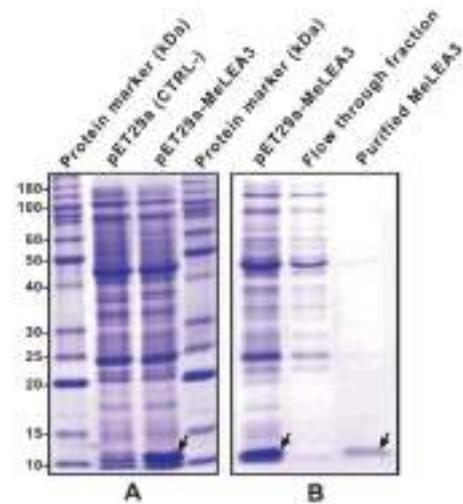


Figure 1. SDS-PAGE of total protein samples from bacteria cells expressing the pET29a-MeLEA3 construct and an empty pET29a vector (negative control) (A) and protein fractions from purification of recombinant MeLEA3 protein using a NiTA-agarose column (B). The arrows point to the 10 kDa MeLEA3 protein.

This 10 kDa protein band detected by SDS-PAGE is in accordance with predicted molecular weight of MeLEA3 reported by Costa *et al.* [34]. MeLEA3 was also predicted to be synthesized as a precursor containing an N-terminal presequence of 46 amino acids that is probably cleaved after protein to be imported into the mitochondria, resulting in a 5

kDa mature protein [34]. It is known that LEA proteins are small molecular weight proteins with possible localization in the cytoplasm, and also in organelles, such as nucleus, mitochondria and chloroplast. In *Arabidopsis thaliana*, 13 genes coding mainly for LEA3 and LEA4 proteins predicted to be located in chloroplast/mitochondria were identified [13]. In *Prosopis juliflora*, a 10 kDa atypical LEA protein, named PjLEA3, predicted to be located in chloroplast/mitochondria showed potential role in response to dehydration [20]. Roles of mitochondrial LEA proteins include the protection of mitochondrial membrane [25] and enzymes of mitochondrial matrix, such as fumarate and rhodanese, during desiccation [45].

Bacteria Cells Protection Against Abiotic Stress is Conferred by the Recombinant MeLEA3 Protein

Our previous studies revealed MeLEA3 as an atypical LEA protein, with a slightly hydrophobic pattern and the amino-terminal sequence more hydrophobic than the carboxyl-terminal. Also, these studies showed MeLEA3 with potential function on salt stress response in cassava, according to gene expression analysis using semi-quantitative RT-PCR assays [34].

Although the most of functional studies of LEA proteins are focused on very hydrophilic typical LEA proteins, some few investigations have shown atypical LEA proteins with functions in tolerance to abiotic stress. They include functional analysis of atypical LEA in transgenic plants [21,22] and heterologous expression in bacteria [22,36] and yeast [21]. Therefore, to test if the recombinant MeLEA3 could show a tolerance function in bacteria cells against abiotic stress, we evaluated the growth of bacteria cells expressing the pET29-MeLEA3 construct under salt and heat treatments.

For salt stress assays, the recombinant MeLEA3 was expressed in bacterial cells under different concentrations of NaCl (0, 250, 500 and 750 mM) for 12 hours, and bacterial growth was monitored by absorbance at 600 nm. As depicted in Fig. 2, our results showed no differences in growth rates of bacteria expressing the recombinant MeLEA3 and bacteria control cells transformed with an empty pET29a vector under 0 mM or 250 mM NaCl. However, under high salt treatment (500 mM and 750 mM NaCl) bacteria expressing the recombinant MeLEA3 showed growth advantage in comparison to the control cells, confirming that MeLEA3 protein contributed for protection of bacteria cells against salt stress. This result is accordance with other studies of atypical and typical LEA proteins. For example, the over-expression of SiLEA14, an atypical LEA from foxtail millet, improved *E. coli* growth performance under salt stress [22]. Likewise, the OsLEA5, an atypical hydrophobic LEA protein from *Oryza sativa*, was able to protect bacteria cells against salt stress [36]. As examples of typical LEA proteins, the PgLEA from *Phaseolus glaucus* conferred protection against salt stress in bacteria cells [35], while PM2 protein from soybean protected *E. coli* under high salt or temperature treatments [38,39]. Therefore, we can conclude that our result obtained here corroborated previous data of *in vivo* salt stress in cassava leaves [34], indicating that MeLEA3

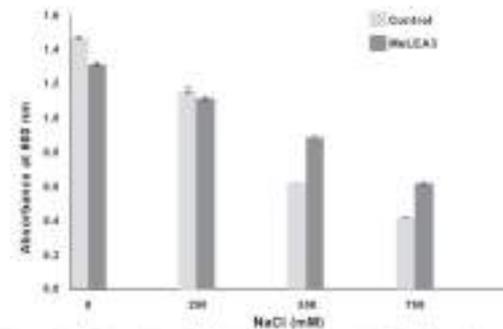


Figure 2. Evolution of effect of recombinant MeLEA3 protein on bacterial growth under salt stress. Bacteria cells transformed with pET29a-MeLEA3 construct were submitted to different concentrations of NaCl (0, 250, 500 and 750 mM) with 1 mM IPTG for 12 hours, followed by evaluation of absorbance at 600 nm. Bacteria cells transformed with an empty pET29a vector were used as control.

protein can also confer *in vivo* protection against salinity in cassava plant.

Besides protection against salt stress, we also evaluated the effect of recombinant MeLEA3 protein in bacterial growth during heat stress. Bacteria cells expressing the MeLEA3 construct were submitted to different temperatures (37°C, 45°C and 50°C) for 12 hours, and bacterial growth was monitored by absorbance at 600 nm. Our results revealed that at high temperature (45°C and 50°C) the bacterial growth rates were significantly reduced in both bacteria cells expressing the pET29-MeLEA3 construct and an empty pET29a vector in comparison with bacterial growth at 37°C (Fig. 3), confirming the effect of high temperature in inhibition of bacterial growth. Our results also revealed that MeLEA3 protein contributed to tolerance of bacteria to heat stress, since at high temperature the bacteria cells expressing the pET29-MeLEA3 construct showed a growth advantage in comparison to control cells (Fig. 3).

These our results are also in agreement with the literature, where other studies have reported LEA proteins conferring tolerance against heat stress in bacteria. For example, the expression of PM2 protein from soybean protected *E. coli* under high temperature treatments [38,39]. Likewise, the PgLEA showed protection against heat stress in bacteria cells [35]. Among protective roles of LEA proteins against abiotic stress, it is known that they can act as molecular shields by reducing aggregation of dehydration-sensitive proteins [46-48]. Also, LEA proteins can act as chaperones by interacting with other proteins, stabilizing and preserving the native structure and function of them [24,49,50]. Chaperone activity of LEA proteins can involve an anti-aggregation mechanism preventing the formation of damaging protein aggregates, and stabilizing proteins in a partially unfolded state caused by environmental stress [24,49,50].

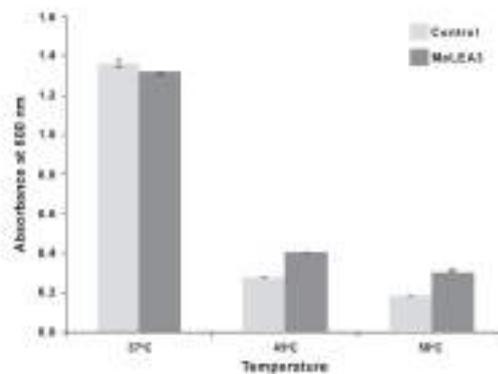


Figure 3. Evaluation of effect of recombinant MeLEA3 protein on bacterial growth under heat stress. Bacteria cells transformed with pET29a-MeLEA3 construct were submitted to different temperatures (37°C, 45°C and 50°C) with 1 mM IPTG for 12 hours, followed by evaluation of absorbance at 600 nm. Bacteria cells transformed with an empty pET29a vector were used as control.

Protection of *NdeI* Restriction Enzyme from Heat Inactivation by MeLEA3 Protein

Based on our results of growth of bacteria expressing the MeLEA3 under salt and heat stress, we hypothesized that MeLEA3 could contribute to tolerance to abiotic stress as a molecular chaperone. Then, we performed chaperone activity assays of purified MeLEA3 and evaluated if this protein could protect the *NdeI* restriction enzyme against inactivation by heat stress. DNA samples of pGEM-3Z vector were digested with *NdeI* at 50°C in the presence or absence of recombinant MeLEA3 (2.0 µg), followed by analysis on agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. Our results showed that *NdeI* activity was partially inactivated by heat at 50°C, according to comparison with DNA sample digested at 37°C (Fig. 4). Also, MeLEA3 protein conferred a protective function to *NdeI* at 50°C, since the sample containing this protein showed a DNA band of linearized plasmid more intense than sample without MeLEA3, indicating a better digestion by *NdeI* on the presence of MeLEA3. In addition, our results showed that the digestion pattern of sample containing MeLEA3 was very close to sample control containing DNA vector digested at 37°C, an optimal temperature for *NdeI* activity (Fig. 4). Thus, we concluded that MeLEA3 protein showed chaperone activity by stabilization and preservation of *NdeI* function under heat stress conditions used here.

In this work, we reported for the first time the heterologous expression of a LEA protein from cassava in *E. coli* and the evaluation of tolerance of bacteria expressing this protein under abiotic stress. Despite it is not our goal elucidate mechanisms by which recombinant MeLEA3 protein protected bacteria cells against salt and heat stress, it is known that LEA proteins can display similar mechanisms of protection against abiotic stress in both prokaryotes and eukaryotes

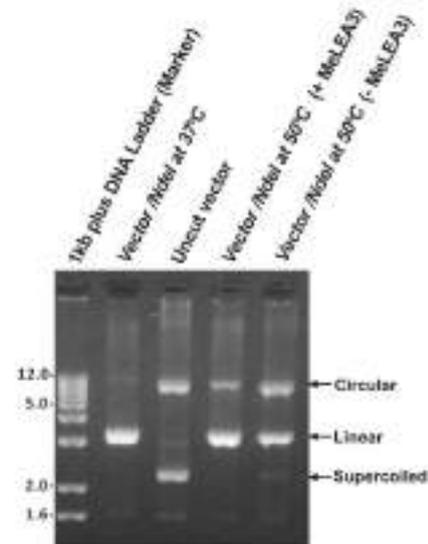


Figure 4. Assays of protection of *NdeI* restriction enzyme from heat inactivation by recombinant MeLEA3 protein. DNA samples of pGEM-3Z vector were digested by *NdeI* at 50°C in the presence or absence of recombinant MeLEA3 and analyzed on agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. Samples of DNA vector digested by *NdeI* at 37°C and uncut DNA vector were used as controls.

cells [10]. Additionally, besides functional studies of atypical LEA from plants in bacteria [22,36] and yeast [21], transgenic plants over-expressing such genes have also confirmed the LEA roles in increasing of tolerance to abiotic stress [21, 22], thus it is possible that MeLEA3 has a similar function in cassava. Since MeLEA3 protein is predicted to be located in mitochondria, is possible that this protein contributes as a molecular chaperone in protection of proteins and enzymes of mitochondrial matrix during abiotic stress, such high temperature; however, further studies are necessary to elucidate the exact molecular function of MeLEA3 protein in cassava plant. The findings obtained here indicate that MeLEA3 has potential as candidate gene to generation of genetically engineered crops with tolerance to abiotic stress.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) and Universidade Federal do Pará (UFPA), Brazil.

REFERENCES

- [1] Dani, L.H.I.; Greenway, S.C.; Galim, G.A. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 4162-4168.
- [2] Galim, G.A.; Hughes, D.W.; Dani, L.H.I. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.*, **1986**, *7*, 155-170.
- [3] Baker, J.; Szekely, C.; Dani, L.H.I. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.*, **1988**, *11*, 273-280.
- [4] He, J.X.; Fu, J.R. Research progress in Lea proteins of seeds. *Plant Physiol. Commun.*, **1996**, *32*, 241-246.
- [5] Battaglia, M.; Ojeda-Carrillo, Y.; Garciamiró, A.; Campos, F.; Covarrubias, A.A. The embryonic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.*, **2008**, *148*, 6-24.
- [6] Battaglia, M.; Covarrubias, A.A. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Front. Plant Sci.*, **2013**, *4*, 191.
- [7] Donkersoort, N.V.; Rathbun, R.; Kubo, M.; Labrous, E. Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in nonassociated, uncycled, and diapausing embryos of rotifers. *Biol. Reprod.*, **2010**, *82*, 714-724.
- [8] Browne, J.A.; Dolan, K.M.; Tyson, T.; Gayal, K.; Tansacliffe, A.; Bursell, A.M. Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryot. Cell*, **2004**, *3*, 968-975.
- [9] Gal, T.Z.; Glazer, I.; Kishit, H. An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Lett.*, **2004**, *557*, 21-26.
- [10] Stacy, R.A.; Aalen, R.B. Identification of sequence homology between the mammalian hydrophilic repeated motifs of group 1 late embryogenesis abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein Gull of *Desulfobacter salinarum*. *Planta*, **1998**, *206*, 478-478.
- [11] Dani, L.H.I.; Crouch, M.; Harada, J.; Ho, T.-H.D.; Mansly, J.; Quattaro, K.; Thomas, T.; Sung, Z.R. Conserved amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, **1989**, *12*, 475-486.
- [12] Tansacliffe, A.; Wise, M.J. The continuing construction of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, **2007**, *94*, 791-812.
- [13] Handwerker, M.; Hincha, D.K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, **2008**, *9*, 118.
- [14] Jaspard, E.; Macherel, D.; Hanaoui, G. Computational and statistical analysis of amino acid usage and physico-chemical properties of the twelve late embryogenesis abundant protein classes. *PLoS ONE*, **2012**, *7*, e36968.
- [15] Wise, M.J.; Tansacliffe, A. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci.*, **2004**, *5*, 13-17.
- [16] Galim, G.A.; Wang, H.Y.; Hughes, D.W. Cotton *lea5* and *lea14* encode atypical late embryogenesis-abundant proteins. *Plant Physiol.*, **1993**, *101*, 695-696.
- [17] Naoe, D.; Ben-Hayyim, G.; Eshdat, Y.; Hefetz, D. Drought, heat and salt stress induce the expression of a citrus homologue of an atypical late-embryogenesis *Lea5* gene. *Plant Mol. Biol.*, **1995**, *27*, 619-622.
- [18] Zegzouti, H.; Jahan, B.; Marty, C.; Leflèvre, J.M.; Latché, A.; Peck, J.C.; Banzayer, M. ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Mol. Biol.*, **1997**, *35*, 847-854.
- [19] Kim, H.S.; Lee, J.H.; Kim, J.J.; Kim, C.H.; An, S.S.; Hong, Y.N. Molecular and functional characterization of CuLEA5, the gene for a hydrophilic LEA protein from *Capsicum annuum*. *Genet.*, **2005**, *344*, 115-123.
- [20] George, S.; Usha, B.; Parida, A. Isolation and characterization of an atypical LEA protein coding cDNA and its promoter from drought-tolerant plant *Prosopis juliflora*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2009**, *157*, 244-253.
- [21] Liu, Y.; Wang, L.; Jiang, S.; Pan, J.; Cai, G.; Li, D. Group 5 LEA protein, ZmLEA5C, enhance tolerance to osmotic and low temperature stresses in transgenic tobacco and yeast. *Plant Physiol. Biochem.*, **2014**, *84*, 22-31.
- [22] Wang, M.; Li, P.; Li, C.; Pan, Y.; Jiang, X.; Zhu, D.; Zhao, Q.; Yu, J. SLLEA14, a novel atypical LEA protein, confers abiotic stress resistance in fetal rat. *BMC Plant Biol.*, **2014**, *14*, 293.
- [23] Amara, J.; Zaidi, I.; Mammouh, K.; Luukkonen, M. D.; Pajala, M.; Geday, A.; Brixi, A. Insights into late embryogenesis abundant (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. *Ann. J. Plant Sci.*, **2014**, *5*, 3440-3455.
- [24] Kovacs, D.; Kálnai, E.; Tomák, Z.; Tompa, P. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol.*, **2009**, *147*, 381-390.
- [25] Telleter, D.; Inquadró, M.; Morgensiel, C.; Passtrani, C.; Sackler, P.; Mason, S.; Tronari, E.; Puyet, N.; Avila-Lago-Machuel, M.H.; Macherel, D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell*, **2007**, *19*, 1589-1599.
- [26] Han, M.; Terashima, S.; Kubo, T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J. Plant Physiol.*, **2001**, *158*, 1333-1339.
- [27] Sanchez-Ballesta, M.T.; Rodrigo, M.J.; Lallena, M.T.; Graciel, A.; Zanarias, L. Dehydrin from Citrus, which confers *in vitro* dehydratation to freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the florets of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 1950-1957.
- [28] Han, M.; Terashima, S.; Fukaya, T.; Kubo, T. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, **2003**, *217*, 290-298.
- [29] Han, M.; Fajana, M.; Kubo, T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiol. Biochem.*, **2004**, *42*, 657-662.
- [30] Boacher, V.; Baitink, J.; Liu, X.; Boudet, J.; Hockema, F.A.; Handwerker, M.; Renaud, D.; Leprieux, G. MIPM25 is an atypical hydrophilic late embryogenesis abundant protein that dissociates cold and desiccation-accumulated proteins. *Plant Cell Environ.*, **2010**, *33*, 418-430.
- [31] Xiao, B.; Huang, Y.; Tang, N.; Xiong, L. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor. Appl. Genet.*, **2007**, *115*, 55-66.
- [32] Yao, Y.; Chen, S.; Huang, H.; Jiang, J.; Bai, S.; Liu, G. Improved salt tolerance of *Populus deltoides* × *P. bolleana* overexpressed LEA from *Tamarix arabisusensis*. *J. For. Res.*, **2014**, *23*, 813-818.
- [33] de Souza, C.R.; Carvalho, L.L.; de Matos Cascardo, J.C. Comparative gene expression study to identify genes possibly related to storage root formation in cassava. *Protein Pept. Lett.*, **2004**, *11*, 573-582.
- [34] Costa, C.N.M.; Santa Brígida, A.B.; Borges, B.N.; Moraes-Neto, M.A.; Carvalho, L.J.C.B.; de Souza, C.R.B. Levels of MLEA3, a cDNA sequence coding for an atypical late embryogenesis abundant protein in cassava, increase under *in vitro* salt stress treatment. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **2011**, *29*, 997-1005.
- [35] Reddy, P.S.; Reddy, G.M.; Pandey, P.; Chandrasekhar, K.; Reddy, M.K. Cloning and molecular characterization of a gene encoding late embryogenesis abundant protein from *Passiflora glauca*: protection against abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.*, **2012**, *39*, 7163-7174.
- [36] He, S.; Tan, L.; Ha, Z.; Chen, G.; Wang, G.; Ha, T. Molecular characterization and functional analysis by heterologous expression in *E. coli* under diverse abiotic stresses for OsLEA5, the atypical hydrophilic LEA protein from *Oryza sativa* L. *Hereditas*, **2012**, *34*, 39-54.
- [37] Liu, Y.; Cai, D.; Zheng, Y.-Z. Expression in *Escherichia coli* of three different soybean late embryogenesis abundant (LEA) genes to investigate enhanced stress tolerance. *J. Agric. Plant Biol.*, **2005**, *47*, 611-621.
- [38] Liu, Y.; Zheng, Y.-Z. PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *337*, 325-332.
- [39] Liu, Y.; Zheng, Y.; Zhang, Y.; Wang, W.; Li, R. Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of *Escherichia coli* and stabilization of enzyme activity under diverse stresses. *Curr. Microbiol.*, **2010**, *60*, 373-378.
- [40] Dani, A.A.; Tomba, E.; Lenardon, R.; Richard, R.; Bagajewicz, M.J.; Harrison, K.G. Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2010**, *395*, 574-583.

Heterologous Expression of McLEA3: A 19 kDa Late Embryogenesis

Protein & Peptide Letters, 2015, Vol. 22, No. 8 695

- [41] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*, 680-685.
- [42] Serna Brígida, A.B.; dos Reis, S.P.; Costa, C.N.M.; Cardoso, C.M.; Lima, A.M.; de Souza, C.B. Molecular cloning and characterization of a cancer transcriptionally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response. *Mol. Biol. Rep.*, **2014**, *41*, 1783-1793.
- [43] Hess, J.F.; FitzGerald, P.G. Protection of a restriction enzyme from heat inactivation by α -Crystallin. *Mol. Vis.*, **1998**, *4*, 25-32.
- [44] Birnboim, H.C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **1979**, *7*, 1513-1523.
- [45] Grellet, J.; Benamar, A.; Tréssier, E.; Avouange-Machereil, M-F.; Gourvillat, D.; Machereil, D. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.*, **2005**, *157*, 157-167.
- [46] Chakraborty, S.; Boucher, C.; Walton, L.J.; Saito, S.; Robinson, D.C.; Tammelli, A. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **2007**, *104*, 19073-19078.
- [47] Chakraborty, S.; Tripathi, R.; Watson, M.; Schiote, G.S.; Karniwa, D.P.; Kaminaki, C.F.; Wise, M.J.; Tammelli, A. Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Mol. Biocyt.*, **2012**, *8*, 210-219.
- [48] Hatanaka, R.; Hagiwara-Komoda, Y.; Furuki, T.; Kanemori, Y.; Fujita, M.; Cornette, R.; Sakurai, M.; Okada, T.; Kawasaki, T. An abundant LEA protein in the orthohibiscus midge, PsLEA4, acts as a molecular shield by limiting growth of aggregating protein particles. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **2013**, *47*, 1055-1067.
- [49] Hart, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **1996**, *381*, 571-580.
- [50] Hart, F.U.; Hayer-Hart, M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2009**, *16*, 574-581.

Received: February 1, 2015 Revised: May 01, 2015 Accepted: May 15, 2015

ANEXO A – Diretrizes para os autores do periódico *Protein & Peptide Letters*Send Orders for Reprints to reprints@benhamscience.net

Journal Name, Year, Volume

1

Title: (The Title of the Article should be Precise and Brief and Must Not be More Than 120 Characters. Authors should avoid the Use of Non-Standard Abbreviations. The Title Must be Written in Title Case Except for articles, conjunctions and prepositions.)

Principal Author^a, Corresponding author^b, Co-author¹, Co-author^{2a} and Co-author^{3a}

(The author will be required to provide their full names, the institutional affiliations and the location, with an asterisk in front of the name of the principal/corresponding author).

^aDepartment Name, Faculty Name, University Name, City, Country; ^bDepartment Name, Faculty Name, University Name, City, Country

Abstract: The abstract should not exceed 250 words for review papers summarizing the essential features of the article.

Keywords: 6 to 8 keywords must be provided.



1. INTRODUCTION

The Introduction section should include the background and aims of the research in a comprehensive manner, for the researchers.

1.1. Section headings

Section headings should be numbered sequentially, left aligned and have the first letter capitalized, starting with the introduction. Sub-section headings however should be in lower-case and italicized with their initials capitalized. They should be numbered as 1.1, 1.2, etc. A page break may be inserted to keep a heading along with its text.

1.2. General guidelines for the preparation of your text

Please provide soft copies of all the materials (main text in MS Word or Tex/LaTeX), figures/illustrations in TIFF, PDF or JPEG, and chemical structures drawn in ChemDraw (CDX)/ISISDraw (TGF) as separate files, while a PDF version of the entire manuscript must also be included, embedded with all the figures/illustrations/tables/chemical structures etc. It is advisable that the document files related to a manuscript submission should always have the name of the corresponding author as part of the file name, i.e., "Cilli MS text.doc", "Cilli MS Figure 1" etc.

It is imperative that before submission, authors should carefully proofread the files for special characters, mathematical symbols, Greek letters, equations, tables, references and images, to ensure that they appear in proper format.

^aAddress correspondence to this author at the Department of xxx, Faculty of xxx, xxx University, P.O. Box: 0000-000, City, Country; Tel/Fax: ++0-000-000-0000, ++0-000-000-0000; E-mail: author@university.xxx

References, figures, tables, chemical structures etc. should be referred to in the text at the appropriate place where they have been first discussed. Figure legends/ captions should also be provided.

1.3. Figures/illustrations:

All authors must strictly follow the guidelines below for preparing illustrations for publication. If the figures are found to be sub-standard, then the manuscripts will be rejected/ and the authors offered the option of figure improvement professionally by Eureka Science. The costs for such improvement will be charged to the authors.

Illustrations should be provided as separate files, embedded in the text file, and must be numbered consecutively in the order of their appearance. Each figure should include only a single illustration which should be cropped to minimize the amount of space occupied by the illustration.

If a figure is in separate parts, all parts of the figure must be provided in a single composite illustration file.

Photographs should be provided with a scale bar if appropriate, as well as high-resolution component files.

1.3.1. Scaling/Resolution:

Line Art image type is normally an image based on lines and text. It does not contain tonal or shaded areas. The preferred file format should be TIFF or EPS, with the color mode being Monochrome 1-bit or RGB, in a resolution of 900-1200 dpi.

Halftone image type is a continuous tone photograph containing no text. It should have the preferred file format TIFF, with color mode being RGB or Grayscale, in a resolution of 300 dpi.

Combination image type is an image containing halftone, text or line art elements. It should have the preferred file format TIFF, with color mode being RGB or Grayscale, in a resolution of 500-900 dpi.

1.3.2. Formats:

Illustrations may be submitted in the following file formats:

- Illustrator
- EPS (preferred format for diagrams)
- PDF (also especially suitable for diagrams)
- PNG (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (version 5 and above; figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- TIFF
- JPEG (conversion should be done using the original file)
- BMP
- CDX (ChemDraw)
- TGF (ISISDraw)

Bentham Science does not process figures submitted in GIF format.

For TIFF or EPS figures with considerably large file size restricting the file size in online submissions is advisable. Authors may therefore convert to JPEG format before submission as this results in significantly reduced file size and upload time, while retaining acceptable quality. JPEG is a 'lossy' format, however. In order to maintain acceptable image quality, it is recommended that JPEG files are saved at High or Maximum quality.

Zipit or Stuffit tools should not be used to compress files prior to submission as the resulting compression through these tools is always negligible.

Please refrain from supplying:

- a) Graphics embedded in word processor (spreadsheet, presentation) document.
- b) Optimized files optimized for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG) because of the low resolution.
- c) Files with too low a resolution.
- d) Graphics that are disproportionately large for the content.

1.3.3. Image Conversion Tools:

There are a number of software packages available, many of them freeware or shareware, capable of converting to and from different graphics formats, including PNG.

General tools for image conversion include Graphic Converter on the Macintosh, Paint Shop Pro, for Windows, and ImageMagick, available on Macintosh, Windows and UNIX platforms.

Bitmap images (e.g. screenshots) should not be converted to EPS as they result in a much larger file size than the equivalent JPEG, TIFF, PNG or BMP, and poor quality. EPS should only be used for images produced by vector-drawing applications such as Adobe Illustrator or CorelDraw. Most vector-drawing applications can be saved in, or exported as, EPS format. If the images were originally prepared in an Office application, such as Word or PowerPoint, original Office files should be directly uploaded to the site, instead of being converted to JPEG or another format of low quality.

1.3.4. Color Figures/Illustrations:

Color figures publication in the journal: The cost for each individual page of color figures is US\$ 950.

Color figures should be supplied in CMYK not RGB colors.

1.3.5. Chemical Structures:

Chemical structures MUST be prepared in ChemDraw/CDX and provided as a separate file.

1.4 Tables:

Tables should be embedded in the text exactly according to their appropriate placement in the submitted manuscript. Table number in bold font i.e. Table 1, should follow a title. The title should be in small case with the first letter in caps.

Data Tables should be submitted in Microsoft Word table format.

1.5. Construction of references

All references should be numbered sequentially (in square brackets) in the text and listed in the same numerical order in the reference section. The reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Sample references are provided at the end of this template in the reference section. Correct reference format and list must be provided in the article.

2. MATERIALS AND METHOD (FOR RESEARCH / LETTER ARTICLES ONLY)

This section provides details of the methodology used along with information on any previous efforts with corresponding references. Any details for further modifications and research should be included.

3. EXPERIMENTAL: (FOR RESEARCH ARTICLES ONLY)-

Repeated information should not be reported in the text of an article. A calculation section must include experimental data, facts and practical development from a theoretical perspective.

4. RESULTS AND DISCUSSIONS: (FOR RESEARCH ARTICLES ONLY)-

The Results and discussions may be presented individually or combined in a single section with short and informative headings.

5. STANDARD PROTOCOL ON APPROVALS, REGISTRATIONS, PATIENT CONSENTS & ANIMAL PROTECTION:

All clinical investigations must be conducted according to the declaration of helsinki principles. Authors must comply with the guidelines of the international committee of medical journal editors (www.icmje.org) with regard to the patient's consent for research or participation in a study.

CONCLUSION

The concluding lines of the article may be presented in a short section of conclusion.

LIST OF ABBREVIATIONS

If abbreviations are used in the text either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided.

CONFLICT OF INTEREST

Financial contributions and any potential conflict of interest must be clearly acknowledged under the heading 'Conflict of Interest'. Authors must list the source(s) of funding for the study. This should be done for each author.

ACKNOWLEDGEMENTS

All individuals listed as authors must have contributed substantially to the design, performance, analysis, or reporting of the work and are required to indicate their specific contribution. Anyone (individual/company/institution) who has substantially contributed to the study for important intellectual content, or who was involved in the article's drafting the manuscript or revising must also be acknowledged.

Guest or honorary authorship based solely on position (e.g. research supervisor, departmental head) is discouraged.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supportive/Supplementary material intended for publication must be numbered and referred to in the manuscript but should not be a part of the submitted paper. List all Supportive/Supplementary Material and include a brief caption line for each file describing its contents.

REFERENCES

Journal Reference:

- [1] Bard, M.; Woods, R.A.; Barón, D.H.; Cornie, J.E.; Widdowson, D.A. Sterol nature of *Saatchiomyces cerevisiae*: chromatographic analyses. *Lipids*, **1977**, *12*(8), 645-654.
- [2] Zhang, W.; Bromberg, S.M.; Mendosa, J.L.; Moore, J.S. A high-yield, one-step synthesis of o-phenylene ethynylene cyclic trimer via precipitation-driven alkyne metathesis. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 10198-10201.

Book Reference:

- [3] Crabtree, R.H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*, 3rd ed.; Wiley & Sons: New York, **2001**.

Book Chapter Reference:

- [4] Whalley, D.M.S.; Wheeler, M.M. In: *Studies in Natural Product Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier Science B. V.: Amsterdam, **1994**; Vol. 14, pp. 3-46.

Conference Proceedings:

- [5] Johnson, D.L.; Withers, S.G.E. In: *Carbohydrate Bioreengineering: Interdisciplinary Approaches*. In: Proceedings of the 4th Carbohydrate Bioreengineering Meeting, Stockholm, Sweden, June 10-13, 2001; Toor, T.T.; Svensson, B.; Gilbert, H.J.; Feizi, T., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **2002**; pp. 3-4.

URL (WebPage):

- [6] National Library of Medicine. Specialized Information Services. Toxicology and Environmental Health. srl.nhl.gov/Tox/TocMain.html (Accessed May 23, **2004**).

Patent:

- [7] Hsieh, J.A.; Huang, S. Screening methods for the identification of novel antibiotics. U.S. Patent 6,043,043, March 28, 2000.

Thesis:

- [8] Mackel, H. *Capturing the Spectra of Silicon Solar Cells*. PhD Thesis, The Australian National University: Canberra, December **2004**.

E-citations:

- [9] Citations for articles/material published exclusively online or in open access (free-to-view), must contain the accurate Web address (URL) at the end of the reference(s), except those posted on an author's Web site (unless editorially essential), e.g. "Reference. Available from: URL".

Some important points to remember:

- All references must be complete and accurate.
- All authors must be cited and there should be no use of the phrase et al.
- Date of access should be provided for online citations.
- Journal names should be abbreviated according to the Index Medicus/MEDLINE.
- Punctuation should be properly applied as mentioned in the examples given above.
- Superscript in the in-text citations and reference section should be avoided.
- Abstracts, unpublished data and personal communications (which can only be included if prior permission has been obtained) should not be given in the references section. The details may however appear in the footnotes.
- The authors are encouraged to use a recent version of EndNote (version 5 and above) or Reference Manager (version 10) when formatting their reference list, as this allows references to be automatically extracted.