

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Gabriela de Castro e Carvalho

Caracterização molecular da mielina do camarão *Litopenaeus vannamei*

Porto Alegre

2010

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caracterização molecular da mielina do camarão *Litopenaeus vannamei*

Dissertação apresentada ao  
programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular  
como requisito para a obtenção  
do título de Mestre.

Autora

Gabriela de Castro e Carvalho

Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica R. Vianna

Porto Alegre

Janeiro, 2010

## RESUMO

Originalmente conceituava-se a mielina como uma inovação evolutiva exclusiva dos vertebrados com mandíbulas, capaz de permitir o aumento na velocidade de transmissão de impulsos nervosos graças à transmissão saltatória. Este conceito tem sido desafiado pela identificação de estruturas morfológicamente equivalentes à mielina em grupos independentes de invertebrados, incluindo anelídeos e crustáceos capazes de garantir propagação de impulsos nervosos em velocidades superiores à de vertebrados. Até o presente momento, a maioria das descrições da mielina dos invertebrados é baseada em dados morfológicos e mostram lamelas com variados graus de compactação e origem celular, envolvendo espiralmente ou concentricamente axônios de diversos calibres nos apêndices corporais ou cordões nervosos destes animais. Para estabelecer as origens evolutivas da mielina e a relação intergrupo, elementos importantíssimos, como a descrição das proteínas componentes, estão faltando. Este trabalho teve como objetivo realizar uma análise do conteúdo protéico da mielina do camarão *Litopenaeus vannamei*. Para identificar as proteínas componentes das lamelas da mielina uma sub-fração enriquecida em mielina preparada a partir do cordão nervoso ventral de animais adultos foi submetida à análise proteômica pela técnica de identificação multidimensional de proteínas (MudPit). MudPit foi escolhido para otimizar a chance de detecção de proteínas carregadas ou transmembranas, que não são detectadas por 2D-PAGE. Dos 23668 peptídeos detectados, 311 proteínas foram identificadas através do emprego dos algoritmos Mascot e Blast, entre as quais proteínas constituintes do sistema nervoso previamente reportadas nas frações de mielina de vertebrados. Quando proteínas típicas da mielina de vertebrados foram procuradas, apenas peptídeos relacionados à proteína proteolipídica (PLP) foram identificados. Uma busca complementar por seqüências de PLP no banco de dados de ESTs de *L. vannamei* resultou na identificação de seqüências adicionais. Estes achados demonstram que as proteínas presentes na mielina do *L. vannamei* refletem um perfil semelhante a frações de mielina de vertebrados, e também a identificação de seqüências relacionadas a PLP, uma das proteínas mais abundantes na mielina dos tetrápodes, pela primeira vez. Com base na identificação de múltiplos peptídeos correspondendo a domínios imunoglobulina típicos de proteínas de adesão na fração de mielina do camarão, utilizamos um anticorpo capaz de reconhecer as duas isoformas da glicoproteína associada à mielina (MAG) de mamíferos em cortes de cordão nervoso de *L. vannamei*. Os resultados demonstraram uma ligação específica que deverão ser explorados com estratégias complementares a fim de se confirmar a identidade do antígeno presente na mielina do camarão. Estes resultados sugerem a presença de proteínas com características próximas às já descritas na mielina dos vertebrados na mielina de *L. vannamei*. Estes achados, somados a estratégias complementares, podem contribuir para o melhor entendimento do surgimento da mielina ao longo da evolução e da relação entre os grupos de animais que apresentam mielina.

Palavras-chaves: Camarão, *Litopenaeus vannamei*, mielina, proteômica, PLP, MAG.

## ABSTRACT

Originally, the concept of myelin considered it an evolutionary innovation exclusive to jawed vertebrates, but that dogma has been challenged by the identification of structures morphologically similar to myelin in invertebrates' independent groups, including annelids and crustaceans. Until the present moment, the descriptions of invertebrate myelin are mainly based in morphological data and shows sheaths with varied compaction and cellular origin wrapped, both spirally or concentrically, axons with different calibers in appendages and nerve cords. To establish the myelin evolutionary origins and intergroup relationships, very important elements are missing, and that work had as objective study shrimps' myelin from a molecular perspective. Aiming to identify the proteins components *Litopenaeus vannamei* myelin sheaths, a myelin enriched fraction was isolated from adult animals' nerve cords and submitted to Multidimensional Protein Identification Technology (MudPit) proteomic analysis. MudPit was chosen to sidestep the bias of 2D-PAGE against either highly charged or transmembrane proteins. From the 23668 peptides detected, 311 proteins were identified, using the algorithms Mascot and Blast, among which several are nervous system constituents previously reported in vertebrates' myelin fractions, and many immunoglobulin peptides. When vertebrate myelin typical proteins were pursued, however, only peptides related to proteolipid protein (PLP) were identified. Further search for PLP was performed in the *L. vannamei* genome sequence incomplete database and resulted in the identification of additional sequences. These findings demonstrates that shrimp myelin have a proteic profile similar to vertebrates' myelin fractions, also was identified, for the first time in that specie, amino acid sequences related to PLP, one of the most abundant protein in tetrapods' myelin. Based on the identification of multiple peptides corresponding to immunoglobulin domains typical from adhesion proteins, was used an antibody that recognizes both mammals' myelin associated glycoprotein (MAG) isoforms in *L. vannamei* nerve cords' frozen section. The results showed a specific binding that needs to be explored with complementary strategies to confirm the identity of shrimp's myelin antigen. This result suggests the presence, in *L. vannamei* myelin, of proteins with similar characteristics to those described in vertebrate myelin. These findings, summed to complementary strategies, can contribute to know better myelin's advent in evolution and the relationship among myelinated animals groups.

Key-words: Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, myelin, proteomic, PLP, MAG.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	3
ABSTRACT .....	4
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	6
1. INTRODUÇÃO .....	7
1.1. Mielina .....	7
1.2. Proteína Proteolipídica (PLP) .....	11
1.3. Glicoproteína Associada À Mielina (MAG) .....	15
1.4. Mielina Em Invertebrados.....	20
1.5. Importância da Identificação das Relações entre a Mielina de Vertebrados e Invertebrados .....	25
1.6. Análise Proteômica.....	26
1.7. Análise Genômica .....	26
1.8. Análise Imunohistoquímica.....	27
2. OBJETIVOS .....	28
2.1. Objetivo Geral .....	28
2.2. Objetivos Específicos .....	28
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO.....	29
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	59
REFERÊNCIAS .....	63
APÊNDICE – Reação de Imunohistoquímica Utilizando Anti-MAG.....	69
ANEXO I – Comprovante de Submissão do Manuscrito .....	72

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## **1 Introdução**

### *1.1 Mielina*

Durante a evolução, mecanismos que aumentassem a velocidade de condução dos impulsos nervosos tornaram-se vantajosos para os organismos que os possuísem e a rápida condução dos impulsos foi uma prioridade para o sistema nervoso destes animais. Dentre os mecanismos surgidos para a resolução deste problema encontram-se o aumento do calibre axonal e a bainha de mielina (Hartline e Colman, 2007).

Além disso, por permitir que finas fibras nervosas possam transmitir o impulso nervoso rapidamente, a presença de mielina levou à compactação dos sistemas nervosos. O processo de mielinização também representa um dos melhores exemplos de cooperação célula-célula. A diferenciação funcional das células formadoras de mielina é dependente e é governada pelo contato físico com os axônios do neurônio (Trapp et al., 2004). Ela ainda promove uma rápida e repetitiva comunicação entre os neurônios e modula a maturação e a sobrevivência dos axônios (Trapp et al., 2004).

A bainha de mielina consiste em uma série de camadas de membranas ricas em lipídios, incluindo altas proporções de cerebrosídeos, que no caso dos vertebrados são galactocerebrosídeos, e ácidos graxos de cadeia longa (Rummler et al., 2004). Ela é uma estrutura multilamelar que contorna e envolve os axônios maiores que 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro de vertebrados, tendo origem em processos celulares das células de Schwann no sistema nervoso periférico e nos oligodendrócitos no sistema nervoso central destes animais.

A mielinização é essencial para a rápida propagação dos potenciais de ação e das funções neurológicas normais (Yin et al., 1998). Para a mielina alcançar suas

propriedades isolantes, estruturas não condutoras e moléculas aquosas do citoplasma devem ser removidas das lamelas membranosas (Waxman e Bangalore, 2004). Durante sua formação, a mielina exclui a maioria dos seus materiais extracelulares e citoplasmáticos fundindo as superfícies citoplasmáticas da sua membrana plasmática, formando uma estrutura chamada linha densa maior. As superfícies exoplasmáticas da membrana plasmática também se fundem, formando as linhas intra-período, conforme mostrado na figura 01 (Rummler et al., 2004).

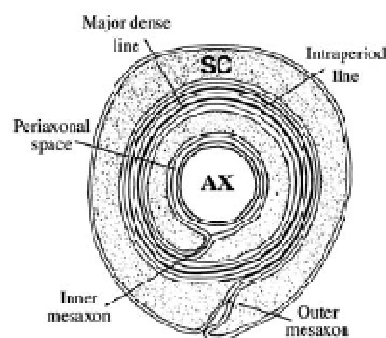


Figura 01 – Diagrama da estrutura da bainha de mielina. No sistema nervoso periférico, a célula de Schwann (SC) circunda o axônio (AX). As linhas densas maiores (*major dense lines*) representam a aposição da superfície citoplasmática, enquanto as linhas intra-período (*intra-period line*) representam a aposição das superfícies extracelulares.

Adaptado de Quarles, 2002.

Enquanto as células de Schwann podem mielinizar apenas um axônio, os oligodendrócitos podem mielinizar vários, podendo chegar até 100 axônios mielinizados pelo mesmo oligodendrócito. O corpo celular do oligodendrócito, diferente da célula de Schwann, usualmente não envolve a sua bainha de mielina e é conectado com ela via pequenas pontes citoplasmáticas (Waxman e Bangalore, 2004), como representado na figura 02. Outras diferenças também existem nas fibras mielinizadas do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico, podendo ser citadas a presença de lâmina basal apenas em torno das fibras mielinizadas do sistema nervoso periférico (Trapp e Kidd, 2004).



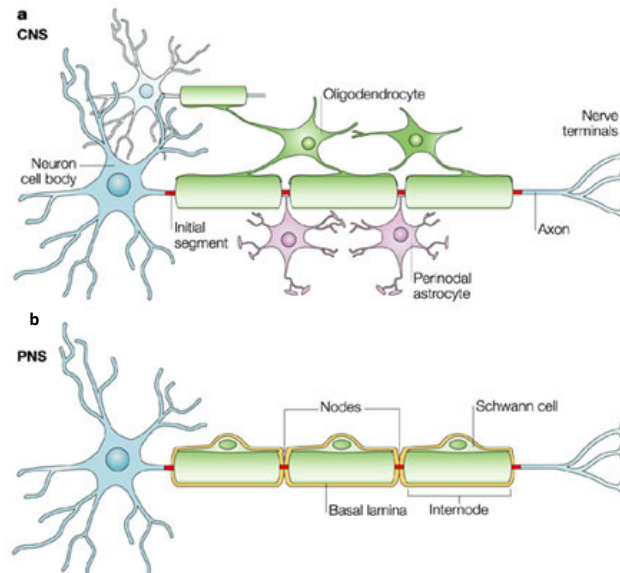


Figura 02 – Representação de um neurônio mielinizado no sistema nervoso central (a) e no sistema nervoso periférico (b), mostrando suas diferenças e partes.  
 Adaptado de Poliak e Peles, 2003.

Morfologicamente, a mielina pode ser dividida em dois tipos: compacta e não compacta. Na mielina compacta, o espaço extracelular entre as lamelas adjacentes tem cerca de apenas 2 nm de espessura, e o citoplasma foi excluído do compartimento. Por outro lado, a mielina não compacta é menos densamente empacotada, tendo o espaço extracelular entre 12 e 14 nm. O espaço intracelular é grande o bastante para manter quantidades significativas de citoplasma e citoesqueleto.

A estrutura de um axônio mielinizado é dividida em domínios conforme é envolvido por mielina compacta e não compacta e ainda de acordo com sub-regiões dentro destas regiões. Regiões de mielina não compacta incluem as incisuras de Schmidt-Lanterman, as membranas abaxonal (que é exposta e interage com o ambiente externo) e adaxonal ou periaxonal (que contacta diretamente com o axônio) e os segmentos próximos aos Nós de Ranvier. Estes domínios, representados na figura 03, carregam um elenco de proteínas específicas bem definido (Kursula, 2008).

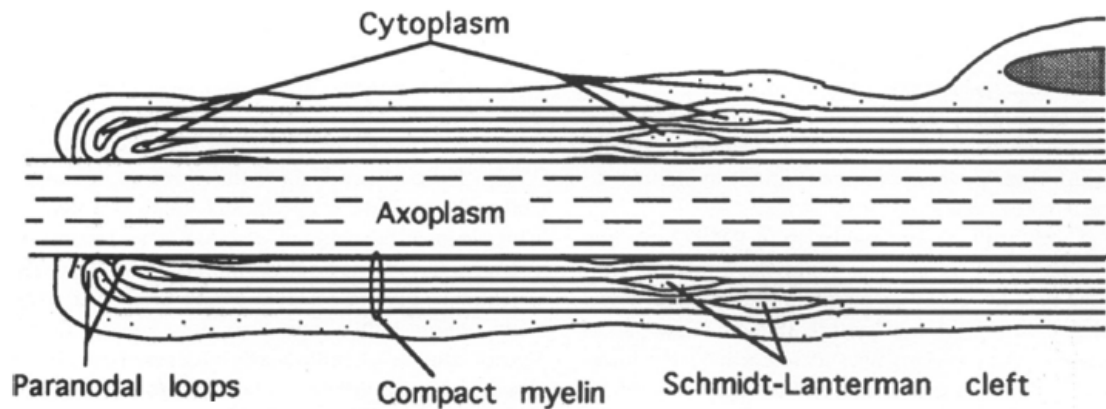


Figura 03 – Regiões da bainha de mielina.  
Adaptado de Snipes e Suter, 1995.

A presença de mielina reduz a capacitância e aumenta a resistência nas regiões internodais. Nos neurônios mielinizados, a corrente passa entre os nodos de Ranvier, que são áreas não mielinizadas dos axônios de 1-1,5 $\mu\text{m}$  no sistema nervoso periférico e 1-10 $\mu\text{m}$  no sistema nervoso central (Fig.01), enriquecidas em canais de sódio voltagem dependentes, em um tipo de condução de corrente chamada de transmissão saltatória. Nos locais em que envolve o axônio, a bainha diminui a capacitância transversa entre o lado interno e externo da fibra nervosa, isto é, reduz a capacidade dos internodos de armazenar energia elétrica, reduzindo a passagem de corrente na superfície internodal (Hartline e Colman, 2007). Esta é uma maneira de garantir a velocidade dos impulsos elétricos em uma maneira energeticamente econômica, prevenindo o “desperdício” de íons ao longo dos segmentos insulados do axônio (Sousa e Bhat, 2007), já que a mielina age como um isolador em torno do axônio.

Embora em menor proporção em relação aos lipídios, a composição protéica da mielina de vertebrados, especialmente de mamíferos, está bem descrita e é bastante característica (Trapp e Kidd, 2004). Parte disto se deve a protocolos de subfracionamento celular capazes de isolar frações enriquecidas de mielina a partir de tecido nervoso (Norton e Poduslo, 1973). As proteínas presentes na mielina do

sistema nervoso central (SNC) e do sistema nervoso periférico (SNP) dos vertebrados apresentam ainda algumas variações em composição e em proporção.

Dentre as mais características na mielina compacta dos vertebrados, as proteínas encontradas incluem a proteína P0, a proteína básica de mielina (MBP), a proteína P2 e a proteína de mielina periférica de 22 kDa (PMP-22) no sistema nervoso periférico, e a proteína proteolípídica (PLP) e as MBPs no sistema nervoso central. Já na mielina não compacta, a glicoproteína associada à mielina (MAG) e a 2',3'-nucleotídeo cíclico 3'-fosfodiesterase (CNPase) estão presentes tanto no sistema nervoso central quanto no periférico, enquanto a glicoproteína da mielina/oligodendrócito (MOG) encontra-se apenas no central.

### *1.2 Proteína proteolípídica (PLP)*

A família de proteínas proteolípídicas compreende proteínas *tetraspan* associadas a lipídeos amplamente distribuídas entre os diversos grupos animais, que evolutivamente apareceram no Bilateria ancestral de protostômios e deuterostômios. As proteínas proteolípídicas também são conhecidas como lipofilinas estão presentes tanto em animais mielinizados e não mielinizados, incluindo diversos grupos de invertebrados (revisado em Möbius et al., 2008). Estas proteínas têm como característica apresentar domínios transmembrana intersectados por pequenos loops hidrofílicos variáveis (Möbius et al., 2008). Um dos membros desta família, a proteína proteolípídica, é uma das proteínas mais abundantes da mielina dos tetrápodes.

A proteína PLP, abreviada do inglês *proteolipid protein*, é essencial para a formação da bainha de mielina e é requerida para a manutenção estrutural da bainha, preenchendo os espaços da linha intraperíodo da mielina. A proteína

proteolípídica e sua isoforma, gerada por *splicing* alternativo, são as proteínas mais abundantes na mielina do sistema nervoso central de mamíferos.

Entre os vertebrados o padrão de expressão dos diferentes homólogos proteolípídicos varia significativamente e é ainda mais complexo pelo *splicing* alternativo do gene *PLP*, que codifica a PLP e a DM-20. Enquanto os peixes cartilaginosos e teleósteos apresentam apenas a DM-20 e os anfíbios expressam somente a PLP, os outros tetrápodes têm diferentes quantidades de ambas as isoformas, diferentemente segregadas nos sistemas nervoso central e periférico (Yoshida e Colman, 1996).

A PLP difere de sua isoforma, chamada DM-20, pela presença de uma seqüência de 35 aminoácidos presentes no segundo loop intracelular, codificada pelo éxon 3, específico para a isoforma PLP.

Originalmente a PLP era considerada uma das características que definiam um oligodendrócito, mas descobriu-se sua expressão em outros tipos de células gliais, incluindo células de Schwann formadoras ou não de mielina. Alguns tecidos não neurais também expressam PLP/DM-20, sendo que ambas isoformas estão presentes no timo e no baço fetal, e apenas a DM-20 é encontrada no coração. Quando o gene é ativado em outros tecidos, usualmente é expressa a isoforma DM-20 (Hudson, 2004).

Esta proteína apresenta uma gama variada de funções, sendo que provavelmente muitas ainda não foram descritas. Estudos em transgênicos demonstraram que camundongos *knockout* para o gene *PLP* têm defeitos na linha intraperíodo, o que resulta em velocidades de condução reduzidas e coordenação neuromotora reduzida (Rosenbluth et al., 1996). A PLP pode agir como uma proteína formadora de poro, permitindo a transferência uni ou bidirecional de vários íons. Imagina-se que a PLP não mantenha a ordem da estrutura da mielina apenas

fisicamente, mas também contribua no equilíbrio iônico da lamela formando poros e liberando informação para a rota de sinalização do inositol hexaquifosfato (Yamagushi et al., 1996). Outra função exercida pela PLP já descrita é que ela é requerida para o transporte da Sirtuína 2 no sistema nervoso central de mamíferos e através disso ter um importante papel na neuroproteção (Werner et al., 2007).

Uma alta conservação é observada na seqüência da PLP entre diversas espécies de mamíferos, mostrando que intensas pressões seletivas moldaram esta proteína, e sabe-se que em humanos, nenhuma mudança na PLP é bem tolerada, o que ocasiona na doença de Pelizaeus-Merzbacher (Hudson, 2004; Möbius et al., 2009). Muitas mutações na PLP resultam em profundas anormalidades nos oligodendrócitos pré-mielinização, incluindo diminuição no número de oligodendrócitos maduros, morte prematura de oligodendrócitos, oligodendrócitos anormais, inclusões e distensões de organela e aumento da proliferação de oligodendrócitos (Yamagushi, 1996).

Durante a evolução dos tetrápodes, a PLP substituiu a imunoglobulina proteína zero (P0) como mais abundante proteína do sistema nervoso central (Yoshida e Colman, 1996; Möbius et al., 2009). O gene vertebrado ancestral codifica apenas a isoforma DM-20 e é coexpresso com a proteína zero nos peixes cartilagosos (Kitagawa et al., 1993; Yoshida e Colman, 1996). Este gene surgiu pela duplicação de um gene ancestral chamado M6B (Schweitzer et al., 2006). O seqüenciamento genômico do *Takifugu rubripes* estabelece a falta de uma região de 105 pares de bases que leva a expressão da PLP nos tetrápodes (Venkatesh et al., 2001). Em anfíbios sabe-se que apenas a PLP é transcrita, enquanto que nos demais tetrápodes o éxon 3, PLP-específico, está presente, mas ambas isoformas são transcritas por *splicing* alternativo. Evolutivamente, acredita-se que a DM-20

ancestral adquiriu o éxon específico da PLP, após a PLP/DM-20 ter se tornado o componente mais abundante na mielina do sistema nervoso central.

As isoformas do gene PLP não apresentam a mesma função, no camundongo a DM-20 é incapaz de suprir as funções da PLP na mielina do sistema nervoso central (Spörkel et al., 2002). O caráter hidrofóbico da PLP é reforçado por ligações covalentes de ácidos graxos de cadeia longa. Na DM-20 faltam dois dos seis sítios de acetilação presente na PLP, uma perda que reduz a hidrofobicidade da DM-20 quando comparada à PLP, e isto altera as propriedades adesivas desta proteína. A mielina composta apenas de DM-20 acumula bolsões citoplasmáticos e apresenta periodicidade aumentada nas lamelas. Sabe-se, então, que a DM-20 não consegue suprir as funções da PLP nos oligodendrócitos (Hudson, 2004).

O gene primordial da família da lipofilina surgiu nos invertebrados (Stecca et al., 2000) e os membros desta família apresentam uma alta conservação dos aminoácidos nos quatro domínios transmembrana, enquanto os domínios extracelulares apresentam maior variabilidade (Weimbs e Stoffel, 1992). Seqüências homólogas a esta família são encontradas também em grupos de Bilateria que não apresentam mielina, o que sugere que estes proteolipídios foram recrutados para mielina a partir de outras funções celulares (Möbius et al., 2009). Diversas proteínas desta família são expressas no sistema nervoso, como a M6, nos invertebrados e a M6A e M6B em vertebrados.

Estudos recentes demonstram que o gene da PLP está presente apenas nos vertebrados tetrápodes, mas consideram que um único gene M6/proteolipídio surgiu no ancestral de Bilateria antes da divergência dos protostômios e deuterostômios (Möbius et al., 2009).

A proteína M6 já foi descrita em *Drosophila*, sendo que ela apresenta o gene com a mesma organização estrutural que as homólogas de vertebrados e imagina-

se que cumpra as mesmas funções, o que ainda não foi confirmado experimentalmente. Não há até o presente momento, indicação que esta proteína tenha sua expressão aumentada no sistema nervoso destes animais. O cDNA relacionado a esta proteína foi clonado por Nested PCR no copepódo *Calanus finmarchicus* e ele apresenta 46% de similaridade com a M6B de camundongo (Möbius et al., 2009)

### 1.3 Glicoproteína associada à mielina (MAG)

A MAG, assim abreviada a partir do inglês *myelin associated glycoprotein*, é uma glicoproteína expressa nas membranas das células gliais formadoras da bainha de mielina. A MAG foi primeiramente detectada em um isolado de mielina do sistema nervoso central de ratos através de experimentos com fucose radioativa (Quarles et al. 1973), e teve sua seqüência de aminoácidos descrita por Salzer et al. em 1987.

A MAG é um membro da família *siglec*, que é um grupo de proteínas dentro da super família das imunoglobulinas e que contém proteínas que são ligantes de ácido siálico (*siglecs*), por isso a MAG também é chamada siglec-4. Ela se liga ao ácido siálico através de um sitio de ligação no seu domínio N-terminal.

A MAG é expressa na região da mielina não compacta dos sistemas nervosos central e periférico, sendo seletivamente localizada nas membranas periaxonais dos oligodendrócitos na bainha de mielina do sistema nervoso central. No sistema nervoso periférico, além das membranas periaxonais, a MAG também está presente nas incisuras de Schmidt-Lanterman, nos *loops* paranodais e nos mesaxônios interno e externo. Além disso, a MAG encontra-se nos paranodos do SNP com uma expressão alta e nos paranodos do SNC com uma expressão moderada (Quarles, 2007).

A MAG apresenta cinco domínios extracelulares *Ig-like*, sendo que o N-terminal é do tipo variável e os domínios 2 a 5 são do tipo constante (Fig. 04). Ela apresenta no domínio extracelular oito sítios para glicosilação N-ligada e os carboidratos perfazem cerca de 30% de seu peso (Quarles, 2002). Seus oligossacarídeos são muito heterogêneos. A maioria é do tipo complexo e são carregados negativamente pela presença do ácido siálico e/ou sulfato. Ela compartilha um carboidrato determinante (HNK-1) com diversas outras moléculas que medeiam as interações célula-célula no sistema nervoso em desenvolvimento, incluindo a molécula de adesão neural (N-CAM) e L1 (McGarry et al., 1983; Kruse et al., 1984).



Figura 04 – Representação da estrutura da MAG indicando as porções intracelular e transmembrana e os cinco domínios extracelulares.  
Adaptado de Quarles, 2002.

Esta proteína tem um único domínio transmembrana e um domínio citoplasmático que ocorre em duas formas devido ao *splicing* alternativo, e assim originando duas isoformas de MAG (Salzer et al., 1987). As duas isoformas da MAG são diferenciadas pelo seu tamanho, sendo que a maior, chamada de L-MAG, tem peso molecular de 72 kDa, e a menor, chamada de S-MAG, tem peso molecular de 67 kDa e são reguladas durante o desenvolvimento. As isoformas compartilham um domínio comum de 36 aminoácidos, que é seguido pelo domínio carboxi-terminal isoforma-específico de 10 ou 54 aminoácidos, para S-MAG ou para L-MAG, respectivamente. No sistema nervoso central, a proteína maior é expressa durante a fase inicial de mielinização, enquanto a menor é sintetizada primariamente quando a mielinização está quase completa (Frail e Braun, 1984), sendo que, no camundongo adulto, ambas as isoformas são detectadas em iguais quantidades (Salzer et al, 1987; Pedraza et al, 1991), apesar disso, no cérebro humano adulto, a isoforma



maior predomina (Miescher et al, 1997). Já no sistema nervoso periférico, a S-MAG é a forma predominante em todas as idades (Quarles, 2002).

O gene da MAG tem aproximadamente 16 kb, consistindo de 13 éxons que formam pelo menos quatro formas diferentes de mRNAs, através do *splicing* alternativo dos éxons 2 e 12. Enquanto o éxon 2 se posiciona na região 5' não codificante do transcrito, a inserção do éxon 12 leva à expressão do domínio citoplasmático mais curto, isto é, a isoforma S-MAG, já que ele tem um códon de parada presente, conseqüentemente, a não inserção deste éxon codifica a isoforma L-MAG (Kirchhoff et al., 1997). Apesar de reguladas diferencialmente no desenvolvimento, ambas atuam basicamente nas mesmas funções, diferindo na transdução dos seus sinais citoplasmáticos.

Esta proteína é altamente conservada durante a evolução de vertebrados, estando presente, além de em mamíferos, répteis e anfíbios, em peixes teleósteos como *zebrafish* e *fugu* (*Danio rerio* e *Takifugu rubripes*, respectivamente) (Lehmann et al., 2004). Contudo, as evidências experimentais sugerem que há uma limitada conservação de seqüência citoplasmática, sugerindo diferentes propriedades entre a MAG de mamíferos e de peixes na transdução de sinais (Quarles, 2007).

Por ser expressa tanto na mielinização quanto nos oligodendrócitos e células de Schwann maduras, a MAG apresenta funções na formação e na manutenção da bainha de mielina, mas suas funções primárias são diferentes no SNC e no SNP, sendo que no SNC ela tem como função principal a sinalização dos axônios para os oligodendrócitos para promover a formação da mielina e no SNP ela é essencial na sinalização da célula de Schwann para o axônio, na manutenção da bainha (Quarles, 2002). Ela media o contato entre a glia e o axônio durante o assentamento da mielina, então foi sugerido que ela é crítica para a segregação dos axônios largos

destinados a serem mielinizados e para a extensão linear da célula glial mielinizante ao longo destes axônios (Owens e Bunge, 1989).

Dados obtidos de animais transgênicos mostram resultados diferentes entre o sistema nervoso central e o sistema nervoso periférico. Observou-se que a formação da mielina é atrasada em camundongos *knockout* para o gene *MAG* no sistema nervoso central (Montag et al., 1994). Comparando com os camundongos do tipo selvagem, apenas metade dos axônios dos gânglios retiniais foram cobertos por mielina compacta nos mutantes *MAG* de dez dias e o nervo óptico de mutantes sem a *MAG* continham mais axônios não mielinizados e pequenos (Montag et al., 1994; Bartsch et al. 1997; Li et al., 1998.). Entretanto, a mielinização no sistema nervoso periférico ocorre normalmente nos camundongos *MAG knockouts* (Li et al., 1994).

A expressão da *MAG* na superfície dos oligodendrócitos tem um papel na manutenção da integridade da mielina (Weiss et al. 2000). Por sua localização, principalmente nas membranas periaxonais e nos *loops* paranodais, ela é claramente envolvida nas interações entre a glia e o axônio, interagindo com receptores da superfície dos neurônios. Diversos receptores foram descobertos como mediadores da *MAG* na superfície dos neurônios, como os gangliosídeos GT1b (Vinson et al., 2001) e GD1a (Vyas et al., 2002), e o receptor NOGO-66 (NgR) (Domeniconi et al., 2002; Liu et al., 2002). Tratamentos *in vitro* de neurônios pós natais de camundongos com a *MAG* tanto nativa (McKerracher et al., 1994) quanto solúvel (Tang et al., 1997), resultam em inibição do crescimento neuronal através do NgR. Também *in vitro*, utilizando-se culturas de neurônios de camundongos, observou-se que a *MAG* interage com os seus diferentes receptores no axônio dependendo do tipo de neurônio em que ela está sendo expressa (Mehta et al., 2007).

A MAG interage com cada tipo de receptor de uma maneira diferente. A interação com os receptores gangliosídicos se dá entre o ácido siálico presente nos mesmos e a arginina 118, dentro do motivo FRG (LQKFRSS), do primeiro domínio imunoglobulina da MAG (Kelm et al., 1994), enquanto com o NgR se dá através do quinto domínio imunoglobulina (Cao et al., 2007).

Surpreendentemente, sabe-se que, no começo do desenvolvimento, a MAG não é inibitória para o crescimento neuronal. A MAG aumenta o crescimento de neurônios cerebelares e da medula espinhal jovens e também neurônios DRG neonatais de camundongos, por um mecanismo ainda não elucidado (Johnson et al., 1989; Mukhopadhyay et al. 1994; Matsuda et al., 1996; Turnley e Bartlett, 1998).

Além do efeito na inibição da regeneração neuronal, a ligação da MAG com receptores axonais é crucial para que a interação entre a bainha de mielina e o axônio se mantenha estável. Diversos estudos com camundongos *knockouts* mostraram anormalidades quando os mesmos eram estudados na fase adulta. Em um destes estudos foi descrito que camundongos entre 12 e 14 meses apresentavam redução na velocidade da condução do impulso nervoso (Weiss et al., 2001). Estudos bioquímicos no cérebro de camundongos MAG-nulos revelaram reduções significantes em diversas proteínas oligodendrogliais consistentes com oligodendropatia. Apesar das proteínas da mielina compacta não terem significante diminuição, o que sugere que a falta de MAG leva os oligodendrócitos a formar a mielina menos eficientemente durante o desenvolvimento e tornando-se distróficos com o envelhecimento (Weiss et al., 2000), e no sistema nervoso periférico os camundongos adultos exibiam uma neuropatia caracterizada pela degeneração dos axônios mielinizados (Fruttiger et al., 1995; Yin et al., 1998).

Em mutantes apenas para a isoforma L-MAG foi visto que os axônios do sistema nervoso central eram envolvidos por mielina redundante e que um pouco de

citoplasma dos oligodendrócitos estava presente. Além disso, os mutantes para L-MAG desenvolveram um rápido tremor no décimo segundo dia pós-natal e espasmos tônicos na idade adulta. Mas o mais interessante é que os camundongos mais velhos não apresentaram sinais de degeneração da mielina e do axônio no sistema nervoso periférico (Fujita et al., 1998).

Também foi descrito, através de experimentos com camundongos deficientes de MAG, que a MAG modula o calibre, o espaçamento entre os neurofilamentos e a fosforilação dos neurofilamentos dos axônios mielinizados (Yin et al., 1998), contribuindo para a capacidade da mielina de afetar a estrutura e a estabilidade dos axônios mielinizados (Franzen et al., 2001), sendo a degeneração semelhante quantitativamente e qualitativamente tanto no SNC quanto no SNP (Pan et al., 2005). Além disso, demonstrou-se *in vivo* que a falta da MAG é associada com a diminuição da atividade de duas quinases, quinase dependente de ciclina-5 (cdk5) e *extracellular signal regulated kinases 1 e 2* (ERK 1/2), o que leva a uma diminuição na fosforilação dos neurofilamentos (Quarles, 2002).

A MAG esta envolvida em algumas doenças autoimunes tais como a neuropatia anti-MAG e a múltipla esclerose, mas as relações dela com esta última ainda não estão bem resolvidas, e ainda não foi descrita nenhuma doença causada por uma mutação no gene da MAG. Então, os danos fisiológicos mais comuns relacionados à MAG são ligados à sua capacidade de inibir regeneração.

#### *1.4 Mielina em invertebrados*

A mielina está ausente nos membros primitivos da linhagem dos vertebrados, como os peixes-bruxa e as lampreias (Bullock et al., 1984). O primeiro vertebrado mielinizado parece ter sido um placoderma (Zalc, 2006), o ancestral dos tubarões e peixes ósseos. Apesar de este ser um tema polêmico, na década de 50 já se

considerava a presença de bainha de mielina em organismos invertebrados e estudos desta época já indicavam a presença de lipídios e proteínas orientadas da mesma maneira na bainha de invertebrados e vertebrados (Geren e Schmitt, 1954). No início dos estudos do sistema em microscopia, as bainhas de mielina foram descritas em vertebrados e invertebrados, mas com o advento da microscopia eletrônica a mielina passou a ser vista como uma inovação dos vertebrados (Hartline e Colman, 2007), entretanto a microscopia eletrônica também revelou que alguns invertebrados de fato apresentam uma bainha de mielina muito semelhante à dos vertebrados em estrutura e função (Heuser e Doggeneiler, 1966; Günter, 1976; Davis et al., 1999).

A presença de olhos e asas, que são considerados casos de evolução convergente, apresenta variações entre as diversas espécies que os possuem, e de maneira semelhante a presença de bainhas que restringem o escape de corrente entre nodos aumentando a velocidade de condução ocorre em crustáceos (classe Malacostraca) e anelídeos (ordens Polychaetes e Oligochaetes), além dos vertebrados, como mostra o cladograma da figura 05.

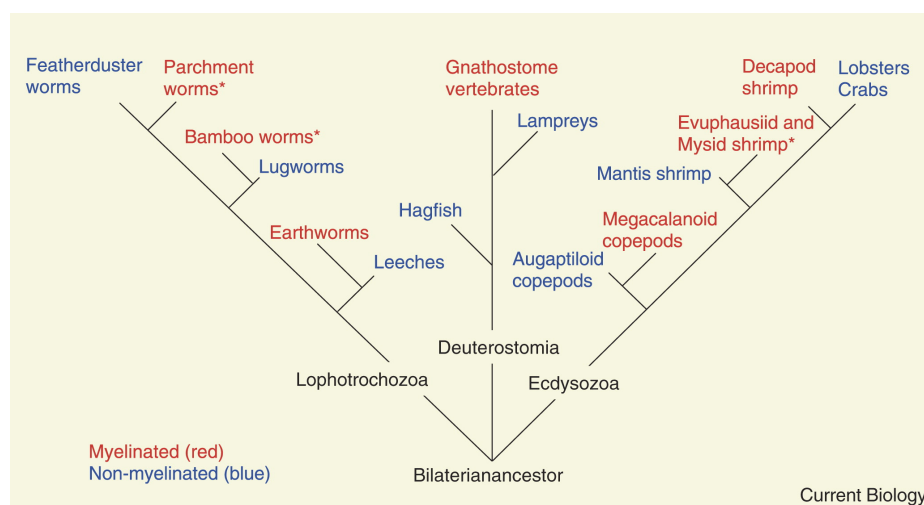


Figura 05 – Filogenia simplificada dos Bilateria, mostrando os taxa relatados portando mielina (vermelho) e os taxa relatados não-mielinizados (azul). Os taxa marcados com asterisco não tem microscopia eletrônica confirmando a mielinização.  
 Fonte: Hartline e Colman 2007.

#### 1.4.1 CRUSTÁCEOS

##### 1.4.1.1 Copépodos

Os copépodos são pequenos crustáceos planctônicos que são os mais abundantes metazoários dos oceanos, e tem tão grande sucesso por que eles têm uma resposta de escape que o acelera 200 vezes o tamanho do corpo por segundo.

A mielina dos copépodos é concentricamente organizada. Ela é compacta nas membranas mais externas da bainha e freqüentemente tem um espaço entre as lamelas, mas não apresenta o espaço submielínico como nos camarões da família Penaeidae. O número de lamelas em uma bainha varia para cada axônio, entre uma até mais de cinquenta. Os copépodos, assim como os camarões da família Penaeidae, não apresentam nodo de Ranvier evidente, tendo apenas pequenas descontinuidades na bainha (Davis et al., 1999). As lamelas concêntricas parecem uniformes sem evidências de que haja pontos de contatos como visto nos decapodas. Os copépodos não apresentam especializações na região paranodal, ao invés disso, a membrana da mielina se torna intimamente associada com o citoplasma do axônio, se não até fundida com ele. Esta associação pode servir para restringir o escape de corrente (Weatherby et al., 2000).

##### 1.4.1.2 Camarões

Os camarões são crustáceos pelágicos da classe Malacostraca, ordem Decapoda, conhecidos por sua rápida velocidade de escape as ameaças ambientais. Podem chegar a apresentar velocidades de condução maiores do que  $200\text{ms}^{-1}$  em neurônios do cordão nervoso ventral, colocando-os entre os animais com as maiores velocidades de condução já medidas, mesmo quando comparados aos vertebrados, sugerindo que estratégias celulares para aumento da velocidade de transmissão dos impulsos sejam empregadas. Dentre os Decapoda, a presença

de mielina foi reportada em camarões da família Palaemonidae (Heuser and Doggenweiler, 1966, Doggeweiler and Heuser, 1967) e da família Penaeidae (Hama, 1966; Kusano, 1966), através de microscopia já na década de 1960.

Na bainha de mielina dos camarões há uma grande concentração de cerebrosídeos, mas, estes são glicocerebrosídeos e não galactocerebrosídeos como nos vertebrados, sendo suas concentrações similares. É interessante também o fato de que a concentração de glicocerebrosídeos é muito maior no sistema nervoso dos camarões do que no das lagostas e dos caranguejos, que também são da classe Malacostraca, mas não apresentam bainha de mielina (Shimomura et al., 1983).

Diferente dos vertebrados, toda mielina de camarões descrita até agora parece ser arranjada concentricamente. Um número de lamelas estende-se de uma única célula de Schwann para embainhar o axônio, cada lamela circunda o axônio apenas uma vez estendendo-se para ambos os lados e se conectando com outra lamela para formar um ponto de contato (Xu e Terakawa, 1999). O núcleo da célula glial nestes animais aparece na lamela mais interna da bainha de mielina, diferindo dos vertebrados, que o tem na lamela mais externa. A mielina dos camarões é às vezes compacta e às vezes apenas semi-compacta, isto é, exclui apenas o espaço extracelular, retendo um pouco do citoplasma. O que é importante é que os espaços condutores entre as membranas estão isolados uns dos outros por uma barreira membranosa ou por apertadas conexões nos pontos de contato (Heuser e Doggenweiler, 1966). Este fato é às vezes subestimado, levando alguns a concluir que invertebrados não tenham mielina verdadeira (Hartline e Colman, 2007).

Nas regiões mais externas da bainha de mielina dos camarões, a membrana apresenta grande compactação, não havendo espaço extracelular, formando uma única linha densa característica. Nestas regiões também há a perda do citoplasma

tornando as membranas muito próximas, tendo, então, a aparência da mielina compacta dos vertebrados (Doggenweiler e Heuser, 1967).

Nas fibras nervosas dos camarões da família Penaeidae, o axônio ocupa apenas uma parte do espaço dentro da bainha de mielina. O resto é ocupado por citoplasma da glia ou um grande espaço extracelular denominado espaço submielínico. Este arranjo peculiar da bainha, especialmente a presença do espaço submielínico, é considerado de suma importância para a alta velocidade de condução nesta família (Hama, 1966; Heuser e Doggenweiler, 1966).

Nos vertebrados, a corrente iônica flui pelos nodos de Ranvier, já nos camarões, que também apresentam condução saltatória (Kusano e Lavail, 1971), os nodos são focais, estando restritos a pequenas aberturas na bainha de mielina (Xu e Terakawa, 1999) e que apresentam estruturas na região paranodal que restringem o desperdício da corrente (Heuser e Doggenweiler, 1966).

#### 1.4.2 ANELÍDEOS

A mielina aparece em duas ordens de anelídeos, nos poliquetas e nos oligoquetas (Roots et al, 1991). Nestes organismos a bainha de mielina é arranjada espiralmente, mas irregularidades no arranjo são freqüentemente observadas. As lamelas são espaçadas irregularmente, não tendo o mesmo grau de organização encontrado na mielina dos vertebrados e ocorrem espaços em que a mielina não é densamente compactada, onde há o citoplasma da célula de Schwann contendo diversas organelas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático, que é chamado de citoplasma interlamelar, não havendo a formação das linhas densas como nos vertebrados. A bainha de mielina dos anelídeos lembra a mielina embriônica dos nervos periféricos dos vertebrados (Hama, 1959).



### *1.5 Importância da identificação das relações entre a mielina de vertebrados e invertebrados*

O fato de que os invertebrados, mesmo aqueles taxa portadores de uma bainha de mielina, têm grande capacidade de regeneração de apêndices e do tecido nervoso ali contido (revisado em: Anderson et al, 1980 e Dinsmore, 2008), leva a necessidade de estudar tal estrutura e entender o que permite a regeneração, comparando com a mielina dos vertebrados, podendo revelar a base para posteriores estudos relacionados à regeneração nos vertebrados.

Uma perspectiva evolutiva na neurociência é de suma importância, e vê-se nos últimos vinte anos uma retomada nestes estudos (Arbas, Meinertzhagen e Shaw, 1991), e dentro deste contexto é de grande validade a análise das relações evolutivas entre os grupos portadores de mielina, já que esta estrutura aparece pelo menos uma vez em cada ramo dos animais bilaterais (Fig. 05).

O entendimento de como o sistema nervoso evoluiu pode ajudar a resolução de detalhes ainda não compreendidos no seu funcionamento, e o estudo destes caracteres pode ser útil na elucidação de filogenias (Harzsch, 2006).

Apesar de bem descritas estruturalmente, não existem trabalhos que analisem as proteínas constituintes da mielina de camarões Penaeidae, entre eles da espécie *Litopenaeus vannamei*, de grande importância comercial. Esta descrição é um passo importante no caminho para o entendimento do surgimento e do funcionamento da mielina neste grupo, bem como pode servir de base para estudos posteriores comparando os demais taxa mielinizados.

### 1.6 Análise proteômica

Recentes avanços na análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) têm permitido a caracterização de proteomas através de PAGE bidimensional (2D) seguido por detecção em MS/MS dos peptídeos obtidos, mas esta técnica detecta proteínas de limitadas cargas e tamanhos (Washburn et al., 2001; Taylor et al., 2004). Muitas proteínas que são constituintes da mielina têm alta carga ou são hidrofóbicas e transmembrana, o que pode impedir sua detecção por técnicas de proteômica mais tradicionais, como 2D-PAGE MS/MS (Roth et al., 2006). A técnica de identificação multidimensional de proteínas (MudPit), uma combinação de cromatografia líquida multidimensional e MS/MS, que permite representação imparcial de proteínas carregadas e/ou transmembranas (Washburn et al., 2001), é uma abordagem que pode contribuir para a identificação de proteínas de difícil detecção com as técnicas de análise proteômica convencionais.

### 1.7 Análise genômica

As iniciativas de seqüenciamento dos genomas de espécies animais vistas na última década levaram a formação de bases de dados que são de grande valia para estudos de caracterização molecular e de relações evolutivas entre estes e outros grupos. Dentre os invertebrados, várias espécies já têm seu genoma seqüenciado, apesar disso o número ainda é pequeno, e já que o investimento de criar estes bancos de dados é alto, tem-se como alternativa os bancos de seqüências expressas (ESTs) (Bouck e Vision, 2007).

O camarão *L. vannamei* tem um banco de ESTs (<http://www.shrimp.ufscar.br/>), que apesar de não representar o genoma completo da espécie, armazena milhares de seqüências (Freitas et al., 2007). A análise das seqüências presentes nestes bancos de dados e as comparações com seqüências relativas a proteínas

conhecidas são ferramentas úteis para iniciar a descrição dos componentes moleculares presentes em tecidos pouco estudados, como a mielina do camarão.

### *1.8 Análise imunohistoquímica*

A técnica de imunohistoquímica é baseada na reação que ocorre quando um anticorpo específico à proteína de estudo é quimicamente acoplado a uma enzima que converte o substrato em um produto colorido, que pode ser analisado ao microscópio, *in situ* e permitir a identificação de determinada proteína em uma amostra e ainda sua distribuição celular e sub-celular. É pré-requisito para o bom funcionamento desta técnica que a estrutura terciária da proteína não esteja alterada na região reconhecida pelo anticorpo (epítipo) a fim de não impedir a ligação do anticorpo. Para a análise ter validade, é necessária a utilização de controles que garantam a especificidade dos resultados, como controles positivo, no qual a presença do antígeno já é conhecida, e negativo, onde o anticorpo específico (primário) é suprimido e não ocorre a reação. Estes controles, usados como comparativos à amostra de tecido marcada, permitem a comparação da presença e distribuição da proteína na amostra estudada e no tecido em que ela é conhecida (Volpicelly-Daley e Levey, 2004).

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Realizar a caracterização molecular da mielina de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as proteínas presentes na mielina dos camarões *L. vannamei*, através de análise proteômica, utilizando-se a técnica de MudPit.
- Avaliar a presença de seqüências de DNA relacionadas às proteínas de mielina através de análises *in silico* do genoma dos camarões *L. vannamei*.
- Avaliar a distribuição de proteínas de mielina por imunohistoquímica em cordões nervosos de camarões da espécie *L. vannamei*.

## **CAPÍTULO 2**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

#### **PROTEOMIC CHARACTERIZATION OF *Litopenaeus vannamei* MYELIN**

**Gabriela de C. e Carvalho, Adriana M. Jeckel, Mônica R. M. Vianna**

**Artigo submetido para publicação no periódico Neuron and Glia Biology**

Title

**Large-scale molecular analysis of an invertebrate myelin:  
*Litopenaeus vannamei* myelin enriched-fraction proteomic  
characterization**

**Authors:** Gabriela Carvalho<sup>1</sup>, Adriana Jeckel<sup>1</sup>, Monica R. M. Vianna<sup>1\*</sup>

**Affiliation:** <sup>1</sup>Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, 90619-900, Brazil

**\*Correspondence to:** Monica R. M. Vianna, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University (PUCRS). Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12C, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203545; fax: +55 51 33203612. E-mail address:

[monica.vianna@pucrs.br](mailto:monica.vianna@pucrs.br)

**Running title:** Proteomic characterization of *Litopenaeus vannamei* myelin

**Manuscript pages:** 25

**Tables:** 1

**Figures:** 4

## **ABSTRACT**

Here we analyze crustacean myelin composition from a molecular perspective. A myelin-enriched fraction from the shrimp *Litopenaeus vannamei* nerve cord was analyzed using multi-dimensional protein identification technology (MudPit). MudPit was chosen to sidestep the bias of 2D-PAGE against either highly charged or transmembrane proteins. Three hundred and eleven proteins were identified among the 23,668 peptides found, including nervous system-specific myelin-fraction associated constituents previously reported in vertebrate myelin. Interestingly, peptides with a high degree of similarity to the mammalian PLP protein sequence were found in shrimp myelin and additional sequences similar to human PLP could be identified in the *Litopenaeus vannamei* EST database. These data suggest that sequence similarity among myelin components of vertebrates and invertebrates may be critical in the establishment of a functional myelin membrane, regardless of the organism in which these proteins are expressed.

**KEY WORDS:** myelin; evolution; *Litopenaeus vannamei*; proteolipid protein; proteomic

## INTRODUCTION

Myelin in deuterostomes has been extensively characterized and is believed to represent a major evolutionary innovation in jawed vertebrates (Zalc and Colman, 2000). Among protostomes, however, myelin sheaths have been reported in crustacea, including shrimps (Hama, 1966; Kusano, 1966), prawns (Doggenweiler and Heuser, 1967; Heuser and Doggenweiler, 1966) and copepods (Davis et al., 1999; Lenz et al., 2000; Weatherby et al., 2000) as well as in annelids (Hama, 1959; Coggeshall, 1965; Cardone and Roots, 1990).

Crustacean myelin sheaths seem to involve a more diverse structural composition and organization (Govind and Pearce, 1988; Xu and Terakawa, 1999) when compared to vertebrates and annelids. Penaeid shrimp myelin includes at least two cellular components in addition to the neuronal axon, one closely associated with the axonal membrane and filled with microtubular fibers, and another responsible for myelin formation, separated by a submyelinic space believed to contribute to axon isolation (Xu and Terakawa, 1999). Nodes to ensure saltatory conduction also seem structurally diverse amongst crustaceans, but regardless of their nature and organization they seem to efficiently ensure fast impulse transmission, as members of this group present some of the fastest velocities in all animal groups (Kusano, 1966; Kusano and Lavail, 1971; Xu and Terakawa, 1999; Weatherby et al., 2000).

Until today, only limited effort has been invested in characterizing myelin molecular composition in invertebrates, a crucial step to unequivocally establish myelin evolutionary origins and intergroup relations. Those studies used myelin-enriched fractions from the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Okamura et al., 1986; Waehneltdt et al., 1989) and the earthworm *Lumbicus terrestris* (Cardone and Roots, 1990) in order to characterize their protein content based on relative electrophoretic mobilities and antibody cross-reactivity. A small number of isolated proteins significantly diverged in molecular weight from those seen



in vertebrate myelin fractions, and exhibited no cross-reactivity with antibodies that recognize mammalian myelin proteins. Further biochemical analyses confirmed the presence of glucocerebrosides as alternatives to vertebrate galactocerebrosides and sulfatides in several crustacean nervous system samples (Shimomura et al, 1983) and a prominently abundant lipid content in the isolated myelin fraction from certain shrimp species (Okamura et al., 1986). These findings however were never extended, and a more detailed proteomic characterization of invertebrate myelin has not been reported. Recent advances in proteomic analytical strategies and expansion of invertebrate genome databases offer new possibilities for the elucidation of invertebrate myelin components and their evolutionary relationships with vertebrates (Hartline and Colman, 2007).

Proteomic characterizations have impacted the current knowledge of myelin composition in vertebrates, contributing to a better understanding of myelin evolution within this group through the combination of results obtained with different approaches (Taylor et al., 2004; Roth et al., 2006). Recent advances in protein and peptide analysis by tandem mass spectrometry (MS/MS) has allowed the characterization of the myelin proteome through bidimensional (2D) PAGE followed by MS/MS detection of the peptides obtained from trypsin digestion of band excised from gels (Taylor et al., 2004). 2D-PAGE shows a bias towards proteins within a limited isoelectric range and size (Washburn et al., 2001; Taylor et al., 2004). Many proteins that are myelin constituents have high charge or are hydrophobic and transmembrane, thus preventing their detection by 2D-PAGE MS/MS (Roth et al., 2006). Invertebrate myelin has not yet been submitted to proteomic analysis and the knowledge acquired with the different protocols used in vertebrate samples can contribute to the identification of proteins in invertebrate myelin and a better understanding of its evolutionary origins.

In this work, we report the proteomic dissection of a purified myelin fraction from the shrimp *Litopenaeus vannamei* by multi-dimensional protein identification technology (MudPit), a combination of multidimensional liquid chromatography and MS/MS that allows

impartial representation of highly charged and/or transmembrane proteins (Washburn et al., 2001). This is the first study revealing the protein composition of invertebrate and shrimp myelin in a broad sense, i.e., without a specific target. One important outcome of our study is the identification in shrimp of a proteolipid-like peptide that in vertebrates is part of a large family of membrane-embedded proteins that were possibly early relatives of certain pore-forming polypeptides (see Kitagawa et al, 1993).

## **OBJECTIVES**

Our main goal was to expand the knowledge about invertebrate myelin molecular composition by analyzing a purified sample of myelin from *L. vannamei* through the protein identification technique MudPit. The results obtained were further analyzed using complementary approaches including search for specific myelin components at the Shrimp EST Genome Project database.

## **METHODS**

### **Animals and myelin purification**

One-hundred adult captive *L. vannamei* from the Waddell Mariculture Center South Carolina Department of Natural Resources were used. This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Pontifical Catholic University (CEUA PUCRS).

Myelin was purified using a non-continuous sucrose gradient ultracentrifugation based on modified protocol from the Norton and Poduslo (1973). Briefly, freshly dissected ventral nerve cords were homogenized in 0.25 M sucrose at pH 7.4 using 1×antiprotease cocktail (ROCHE). The sample sucrose concentration was brought up to 1.1 M by the addition of 1.9

M sucrose. The homogenate was placed at the bottom of an ultracentrifuge tube and layered with 0.25M sucrose followed by water. The tubes were spun overnight at 145000×g in a Sorvall AH-629 swinging bucket rotor (2°C). The 0.00-0.25 M interphase, clearly identified due to the colored nature of the resulting sample distribution, was collected, diluted 1:5 with ice-cold H<sub>2</sub>O and pelleted at 100 000×g and 4°C in a TS865 rotor for 1 hour to concentrate the samples. The pellets were hyposmotically shocked by homogenizing in 20 volumes ice-cold H<sub>2</sub>O and pelleted by repetition of the last procedure, for 3 consecutive times.

### **Transmission Electron Microscopy**

The isolated fraction was prepared to be analyzed using Transmission Electron Microscopy (TEM) at the Facility for Electron Microscopy Research at McGill University. The sample was washed in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, and fixed overnight with a mixture of 2.5% glutaraldehyde (Sigma Aldrich) in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4. Materials were then stained with a mixture of 1% osmium tetroxide and 1.5% aqueous potassium ferricyanide in the cacodylate buffer.

### **Multidimensional protein-identification technology**

100 µg of protein from compact myelin membranes were resuspended in 0.1% SDS, digested in trypsin and subjected to MudPit analysis at the W.M. Keck Facility (Yale University). Myelin membrane samples were divided into 24 cation fractions by multidimensional liquid chromatography, and then analyzed by MS/MS, followed by the direct analysis of amino-acid composition from individual peptide fragments eluted from the chromatography column by Mascot algorithms. In all, 483 proteins were detected, of which 56 were considered to be the most reliable identifications (at least two peptides, one of them unique to the protein in question) (Roth et al., 2006).

### **Protein identification employing the BLAST algorithm**

21.445 peptides that could not be identified using Mascot were analyzed with the algorithm BLAST. 1.172 proteins were detected, of which 255 were considered to be the most reliable identifications using the same cut-off established for MASCOT results.

### **Sequence alignment**

The sequences found in the shrimp myelin samples that had detectable degrees of similarity to vertebrates' proteolipidic proteins were aligned using the Clusral W algorithm implemented in MEGA 4.0 sequences alignment program (Kumar et al., 2004), comparing them to sequences from *Homo sapiens* PLP (P60201.2), *Macaca mullata* PLP (XP\_001088537.1), *Mus musculus* PLP (NP\_035253.1), *Gallus gallus* PLP (P23289.2), *Drosophila melanogaster* M6 (AAF56553.1) and *Homo sapiens* M6 (BAA08712.1), obtained from GenBank .

### **Shrimp genomic sequence analysis**

As a complementary approach, a BLAST search against the Shrimp EST Genome Project database (<http://www.shrimp.ufscar.br>) was performed using the *Homo sapiens* *PLP1* genomic sequence (NM\_000533.3) as a query.

## **RESULTS**

### **Isolation of an enriched myelin fraction from the *L. vannamei* nerve cord**

Okamura et al.(1986) have previously succeeded in isolating a light membrane fraction with a prominently lipidic composition from *Farfantepenaeus duorarum* shrimp nerve cords using a protocol including a 0-0.32M sucrose continuous gradient. Here we used a discontinuous sucrose gradient with wider steps than those previously employed to invertebrate myelin isolation ensuring a stratification of cellular components. Electron

microscopy analysis of the isolated fraction confirmed the presence of multilayered glial membranes with morphological similarities to vertebrates' compact myelin (Figure 1). Interestingly, the layer periodicity of intact stacks resembles that of mammals.

### **Proteomic analysis of *L. vannamei* myelin**

The isolated myelin fraction, solubilized in 0.1% SDS and digested with trypsin, was separated by multidimensional liquid chromatography(MudPit) and the resulting peptides analyzed by MS/MS. From the 23668 peptides found, 311 proteins were identified using combined approaches as follows. A search using the MASCOT algorithm resulted in 56 non-redundant proteins. At the same time, a complementary search using the BLAST algorithm resulted in 255 non-redundant proteins. In both approaches the proteins were identified within a conservative margin of confidence (at least two different peptides detected and one of them unique to the protein in question) (Table 1), a stringency level estimated to eliminate false positives (Elias et al., 2005; Roth et al., 2006).

From the 311 proteins identified, cellular components of neuronal and glial origins were abundant, including some known to be present in vertebrate enriched myelin fractions isolated using different protocols (Ishii et al., 2009; Roth et al., 2006; Taylor et al., 2004).

The proteins identified were classified according to their functional or cellular localization into eight categories according to Huang et al.(2005) in Myelin associated, Surface and plasma membrane, Membranous compartments, Cytoplasmic/cytoskeletal and associated, Cytoplasmic/signaling, Cytoplasmic/metabolic and others, Mitochondrial and Extracellular (Figure 2). The proportion of the proteins allocated to each category is similar to that found by Roth et al. (2006) in a comparable approach applied to rat myelin.

The proteins detected included fifty surface or transmembrane proteins which are not exclusive of myelin, such as ATPases. Cytoplasmic proteins formed the majority of the detected proteins, with many related to metabolic process (34%) such as glycolysis, lipid synthesis and protein maintenance. Other cytoplasmic proteins involved in signal

transduction, cytoskeletal function and/or the function of membranous compartments were also well represented in the myelin sample.

Among the soluble extracellular proteins detected, there were no unusual findings, which is expected considering the extensive washing and osmotic shocks to which the sample was subjected (Roth et al., 2006).

Six independent peptides had significant degrees of similarity to the sequence of members of the proteolipid family of proteins, important constituents of myelin in vertebrates known to have been altered during the evolutionary transition from fish to tetrapods (Yoshida and Colman, 1996; Mobius et al.2008) and were therefore elected for further analysis.

#### **Characterization of amino acid and genomic sequences similar to PLP in *L. vannamei***

Peptides with significant degrees of similarity to PLP and M6 members of the proteolipid family of proteins had their aminoacid sequences aligned. PLP is one of the most abundant constituents of the tetrapod central nervous system compact myelin while, M6 is known to be present in myelinated and unmyelinated animals (Mobius et al., 2008).

Figure 3 shows the alignment of one of the shrimp peptides to the N-terminal region of the proteolipid homologs PLP and M6. That region was chosen because it is both a distinctive region among homologs that shows an overall higher degree of variability among family members and because it had the highest degree of similarity (96% when compared to human and rodent PLP) to the sequences found in *L. vannamei* (Figure 3). Other shrimp peptides also had significant degrees of similarity to other regions of those proteins as depicted in Figure 4.

Based on these findings, we performed a BLAST search in the shrimp EST database from the Shrimp Genomic Project, using as query the human *PLP1* sequence. Although *L. vannamei* genome sequencing is unfinished, we found some sequence similarities between

the human PLP transcript and ESTs from the Shrimp Genomic Project (Figure 4). These similarities were found in the nucleotides that code for the codons 127 to 132 and 139 to 150.

In addition to similarities found between the *PLP* coding region transcript and the *L. vannamei* genome, similarity was found between an untranslated region of PLP also present in the transcript and the *L. vannamei* ESTs. Those similarities were found in the region that comprises the nucleotides 2857 and 3013 (Kronquist et al., 1987).

## **CONCLUSIONS**

- An efficient method to purify myelin was developed and the presence of compact myelin in the shrimp nerve cord confirmed.

- MudPit allowed the identification of proteins from the myelin-enriched fraction, including proteins typical from nervous system samples, including molecules known to be enriched in myelin fractions

- The proportion of the proteins allocated to each cellular category according to their functional and localization characteristics was similar to that found by other authors in comparable approaches to rat myelin.

- Peptides identified in the shrimp myelin fraction showed high similarity to members of the proteolipid family. When amino acid sequences from those peptides and members of the proteolipid family were aligned high degrees of similarity were found, especially at the N-terminal region of the latest molecules.

- Searches performed on the shrimp ESTs database identified additional segments of the proteolipid protein PLP

## **DISCUSSION**

We successfully isolated a myelin-enriched fraction from shrimp nerve cords using subcellular fractioning in a sucrose discontinuous gradient. The purity of the samples resulting from that procedure were confirmed by electronic microscopy demonstration of a lamella periodicity similar to that observed in vertebrate myelin, suggesting that proteins involved in compaction should resemble those from vertebrates' in size, charge and adhesiveness characteristics.

In this study we have used MudPit to characterize, for the first time, the proteome of shrimp myelin. MudPit, which involves trypsin digestion before sample separation, allowed us to detect sequences from one myelin specific protein (PLP), and several other proteins that are known to occur in mammalian nervous system and compact myelin fractions. That methodology was chosen to withdraw the inherent bias of 2D-PAGE against highly charged and/or transmembrane proteins (Roth et al., 2006). When the 311 identified proteins were categorized as done by Roth et al. (2006) for rat myelin we found a similar profile in terms of protein cellular distribution and type, which is particularly relevant since our study is the first proteomic analysis of an invertebrate myelin fraction, and suggests that shrimp myelin organization, in addition to structural and function similarities, shares a similar molecular organization.

The elevated number of peptides found, especially when compared to previous efforts to isolate proteins from myelin-enriched fractions in shrimps (Okamura, 1986; Waehneltd,1989) could be attributed to the tryptic nature of the protocol and to characteristics of the sample and its preparation. Penaeid shrimp axon myelination is known to involve multiple cellular entities, including myelinating Schwann cells separated by a "submyelinic space" from an axon-engulfing microtubule-filled cell and the neuronal axon (Xu and Terakawa, 1999). These components are tightly adhered by several cross and longitudinal attachment zones (Xu and Terakawa, 1999) and we cannot predict how much of



these additional cellular components and their protein constitution are present in the myelin isolated fraction.

The protein profile identified following the MudPit technique reflects the samples' nervous system origin, as nervous system specific or abundant proteins are present. Among nervous system proteins, ionotropic glutamatergic receptors, known to mediate excitatory neurotransmission in crustaceans (Sorenson, 1973) and in vertebrates, and syntaxin and synaptobrevin, members of the SNARE neurotransmitter vesicle exocytosis machinery, were identified. This is, to our knowledge, the first description of syntaxin and synaptobrevin in a Penaeidae shrimp. We also found proteins known to be enriched in myelinated fractions of vertebrates, such as ankyrins, cytoskeletal proteins present in the exposed axonal regions corresponding to Nodes of Ranvier where they play a critical role in ion channel clustering (Kordeli, 1995; Rasband, 2008) and ion channels themselves. A significant amount of peptides corresponding to sodium/potassium ATPases, responsible for saltatory conduction at the Nodes in vertebrates, were found. In shrimps from the Penaeidae family, Nodes are composed by fenestrated openings regularly spaced in the myelin sheath where sodium channels are concentrated at a high density, allowing Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents to be measured (Hsu and Terakawa, 1995; Xu and Terakawa, 1999).

Among the cytoplasmatic/cytoskeletal proteins, tubulin is consistently more abundant than other components, which is in agreement with the presence of the microtubule-filled cell particles in the studied sample (Xu and Terakawa, 1999).

Several peptides corresponding to regions shared by the cell-adhesion proteins of the immunoglobulin superfamily were also detected, as well as one member of the family identified as the neural cell adhesion molecule N-CAM. This abundance is expected since compaction between multiple myelin sheaths and adherence between cellular components relies mostly on these proteins in vertebrate myelin (Shapiro et al., 2007). Myelin specific members of the immunoglobulin superfamily include protein zero (P0), contactin-1 and

myelin-associated glycoprotein (MAG), which play critical roles in vertebrate myelin compaction and axon-glia interaction.

When preparing our myelin-enriched sample, we reduced the levels of mitochondrial contamination by repeatedly subjecting myelin membranes to osmotic shocks and centrifugation. Nevertheless, 4% of all proteins identified belonged to this organelle. That, however, doesn't mean that the fraction wasn't sufficiently purified, as similar results are found in rat myelin proteomic studies (Taylor et al., 2004; Roth et al., 2006). That can be justified by the abundance of mitochondria in myelin due to its high energy requirements, especially when myelination involves multiple cellular types simultaneously as in the shrimp, and it is likely that some mitochondrial membranes present a sucrose-density flotation similar to that found in compact myelin (Sims, 1990). Similarly, soluble extracellular proteins were detected, such as hemocyanin, and their presence can be equally justified (Roth et al., 2006).

Using both proteomic and genomic approaches we found evidences of sequence similarities to the proteolipid protein (PLP) from vertebrates. The proteolipid family comprises tetraspan lipid-associated proteins widely distributed known to have first appeared in a bilaterian ancestral to both protostomes and deuterostomes (Mobius et al., 2008). Proteolipidic proteins, also known as lipophilins, are present in both myelinated and non-myelinated bilateria, including invertebrates (reviewed in Mobius et al, 2008). Among vertebrates the expression profile of different proteolipidic homologs varies significantly and is made even more complex by the existence of splicing alternatives to the *PLP* gene, PLP and DM20. While both cartilaginous and teleost fishes present only DM20 and amphibians express solely the PLP protein, the remaining tetrapods have distinct amounts of the two splicing isoforms differently segregated in central and peripheral nervous system (Yoshida and Colman, 1996). In mammals PLP protein contributes to myelin's unique biophysical properties due to its high affinity to lipids, unusual hydrophobicity and abundance playing a major role in myelin compaction and the mammalian typical myelin periodicity (Popot et al.,

1991; Yamaguchi et al., 1996; Simons et al., 2000). Interestingly, *L.vannamei* compact myelin presents a similar periodicity which is observed both in nerve cord cross sections and in the myelin fraction preserved lamellas.

Using proteomic analysis we found different peptides similar to proteolipid protein sequences in the *L.vannamei* myelin fraction. The sequences corresponded both to portions of the intracellular and extracellular loops and transmembrane segments with varying degrees of similarity. The peptide corresponding to the N-terminal region of lipophilins had a strikingly high similarity of more than 95% to human and rodent PLP. When *L.vannamei* peptides were compared to M6, another member of the family known to be found in invertebrate nervous systems (Stecca et al, 2000; Werner et al, 2001), they were clearly less similar. PLP is considered by several authors to have first appear in tetrapods but members of the proteolipid family are known to be extensively expressed in the nervous system of other invertebrates, including those that lack myelin, suggesting their recruitment from other neural functions due to specific molecular characteristics. PLP's typical hydrophobicity and topology may have been key factors to its inclusion in myelin, but its surprising conformational differences from DM20 (Gow et al, 1997) suggest a level of specificity that may have ensured its selective recruitment to myelin in some organisms.

The low number of PLP peptides found in the shrimp myelin fraction could be attributed to several issues, among them the subcellular fractionation efficiency, specificities of the shrimp myelin cellular organization and limitations of the MudPit proteomic approach. Although we visually confirmed the myelin fraction characteristic lamellas, myelin typically has a very low protein content, a characteristic that is exacerbated in crustaceans where the proportion of lipids to proteins can be as high as 15:1 while in vertebrates and annelids it is around 2:1 (Shimomura, 1983, Okamura et al, 1985). Additionally, compact myelin in the shrimp is restricted to the outermost cellular component. However, as some semi-compact myelin is also present it may account for a less prominent PLP content. Finally, as extensive care was taken to avoid sample contamination and we have evidence from different

databases we do not believe that it could account for these findings. Our analysis was restricted to the peptides resulting from shrimp tryptic digestion proteomics, and did not enable a full protein alignment in order to determine the final degrees of similarity to PLP or other proteolipid family members.

To expand our analysis we looked for *PLP* gene sequences on the yet unfinished shrimp genome sequence database. Similarities were found between *PLP* human transcripts and *L. vannamei* available ESTs reinforcing the above results and pointing to additional similarities to PLP intracellular loops regions (codons 127 to 132 and 139 to 150). Further similarities were also found in a *PLP* untranslated mRNA sequence among the *L. vannamei* ESTs database.

The presence of other typical vertebrate myelin proteins in *L. vannamei* myelin-enriched fraction cannot be ruled out, as the sample preparation and proteomic approaches are known to influence protein identification. Previous studies of mammalian myelin, for instance, have shown that the proteins identified may vary significantly depending on the sample isolation, digestion and proteomic approaches, sometimes even preventing the isolation of a single peptide corresponding to proteins known to be in myelin (Ishii et al., 2009; Roth et al., 2006; Taylor et al., 2004). Other abundant vertebrate myelin components have much more restricted phylogenetic distribution when compared to members of the proteolipid family. Myelin basic protein (MBP), for instance, one of the most abundant mammalian myelin proteins together with PLP, is widely distributed in vertebrates but has not been observed in invertebrate genomes (Gould et al., 2009). Shrimp myelin may involve several additional proteins with biochemical and biophysical characteristics that enable interaction at high lipidic and compacted ambiances that have not yet been identified. Further studies dedicated to characterizing the remaining extensive number of unidentified peptides found in the present study may lead to the identification of shrimp myelin specific components related to this group with unique myelin characteristics. Similarly, additional studies aiming to characterize the protein composition of other invertebrates' myelin are

crucial to understand the different requirements for their varied structures and may contribute to the elucidation of myelin advent along the evolution of different lineages.

Myelin fragments are known to act as major inhibitors of axonal regeneration after injury in vertebrates, with special emphasis in mammals, and myelin proteins are antigens with a major impact in human degenerative and autoimmune diseases such as Multiple Sclerosis (reviewed in Lazzarini, 2004). Invertebrates, in turn, have a great capacity to regenerate their body parts, including their nervous system, at surprising rates. A comparative analysis of shrimp and mammal myelin composition may help the identification of additional components involved in the physiological repair mechanisms that can contribute to nervous system recovery after injury.

Taken together our findings present a comprehensive proteomic analysis of shrimp myelin using MudPit resulting in the identification of proteins known to be either enriched or specific to the nervous system and myelin. We show preliminary data conveying the presence of a proteolipid family member that shares higher similarity to human PLP N-terminus than to M6. Additionally, the completion of the shrimp genome sequencing and further studies aiming to detail these findings and dedicated to overcome the inherent difficulties of proteomic analysis of a mainly lipidic fraction may help elucidate the evolutionary relations of the constituents of myelin from different taxa.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Dr. Pedro M. Galetti for providing access to the Shrimp EST Genome Project and to Al Stokes for contributing with the animals used. Jeannie Mui is thanked for technical support on the TEM analysis. M.R.M.V. was supported by Mount Desert Island Biological Laboratory New Investigator Award and has a CNPq 312137/2006-0 fellowship. G.C. is supported by a Pró-bolsas PUCRS fellowship and A.J. is supported by a PET/SESu/MEC fellowship.

## **Statement of Interest**

None

## REFERENCES

**Bullock T.H., Moore J.K., Fields R.D.** (1984) Evolution of myelin sheaths: both lamprey and hagfish lack myelin. *Neuroscience Letters* 48,145-8.

**Coggeshall R.E.** (1965) A fine structural analysis of the ventral nerve cord and associated sheath of *Lumbricus terrestris* L. *The Journal of Comparative Neurology* 125,393-437.

**Davis A.D., Weatherby T.M., Hartline D.K., Lenz P.H.** (1999) Myelin-like sheaths in copepod axons. *Nature* 398,571.

**Doggenweiler C.F., Heuser J.E.** (1967) Ultrastructure of the prawn nerve sheaths. Role of fixative and osmotic pressure in vesiculation of thin cytoplasmic laminae. *The Journal of Cell Biology* 34,407-20.

**Elias J.E., Haas W., Faherty B.K., Gygi S.P.** (2005) Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nature Methods* 2,667-75.

**Folch J., Lees M.** (1951) Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *The Journal of Biological Chemistry* 191,807-17.

**Gould R.M., Oakley T., Goldstone J.V., Dugas J.C., Brady S.T., Gow A.** (2008) Myelin sheaths are formed with proteins that originated in vertebrate lineages. *Neuron and Glia Biology* 4, 137-152.

**Govind C.K., Pearce J.** (1988) Remodeling of nerves during claw reversal in adult snapping shrimps. *The Journal of Comparative Neurology* 268,121-30.

**Gow A., Gragerov A., Gard A., Colman D.R., Lazzarini R.A.** (1997) Conservation of topology, but not conformation, of the proteolipid proteins of the myelin sheath. *The Journal of Neuroscience* 17,181-9.

**Hama K.** (1959) Some observations on the fine structure of the giant nerve fibers of the earthworm, *Eisenia foetida*. *The Journal of Biophysics and Biochemical Cytology* 6,61-6.

**Hama K.** (1966) The fine structure of the Schwann cell sheath of the nerve fiber in the shrimp (*Penaeus japonicus*). *The Journal of Cell Biology* 31,624-32.

**Hartline D.K.** (2008) What is myelin? *Neuron Glia Biology* 4,153-63.

**Hartline D.K., Colman D.R.** (2007) Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Current Biology* 17,R29-35.

**Heuser J.E., Doggenweiler C.F.** (1966) The fine structural organization of nerve fibers, sheaths, and glial cells in the prawn, *Palaeomonetes vulgaris*. *The Journal of Cell Biology* 30,381-403.

**Holmes W.** (1942) The Giant Myelinated Nerve Fibres of the Prawn. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 231, 293-311.

**Hsu K., Terakawa S.** (1995) Fenestration in the myelin sheath of nerve fibers of the shrimp: A novel node of excitation for saltatory conduction. *Journal of Neurobiology* 30,397 – 409.

**Huang J.K., Phillips G.R., Roth A.D., Pedraza L., Shan W., Belkaid W., Mi S., Fex-Svenningsen A., Florens L., Yates J.R. 3rd, Colman D.R.** (2005) Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth. *Science* 310, 1813.

**Ishii A., Dutta R., Wark G.M., Hwang S.I., Han D.K., Trapp B.D., Pfeiffer S.E., Bansal R.** (2009) Human myelin proteome and comparative analysis with mouse myelin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106,14605-10.

**Kordeli E., Lambert S., Bennett V.** (1995) AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *The Journal of Biological Chemistry* 270,2352-9.

**Kronquist K.E., Crandall B.F., Macklin W.B., Campagnoni A.T.** (1987) Expression of myelin proteins in the developing human spinal cord: cloning and sequencing of human proteolipid protein cDNA. *Journal of neuroscience research* 18,395-401.



- Kumar S., Tamura K., Nei M.** (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5,150-63.
- Kusano K.** (1966) Electrical activity and structural correlates of giant nerve fibers in *Kuruma* shrimp (*Penaeus japonicus*). *Journal of Cellular Physiology* 8,361–383.
- Kusano K., LaVail MM.** (1971) Impulse conduction in the shrimp medullated giant fiber with special reference to the structure of functionally excitable areas. *The Journal of Comparative Neurology* 142,481-94.
- Lazzarini R.A. (ed.)** (2004) *Myelin biology and disorders*. Elsevier Academic Press.
- Lenz P.H., Hartline D.K., Davis A.D.** (2000) The need for speed. I. Fast reactions and myelinated axons in copepods. *The Journal of Comparative Physiology* 186,337-45.
- Möbius W., Patzig J., Nave K.A., Werner H.B.** (2008) Phylogeny of proteolipid proteins: divergence, constraints, and the evolution of novel functions in myelination and neuroprotection. *Neuron and Glia Biology* 4,111-27.
- Norton W.T., Poduslo S.E.** (1973) Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *The Journal of Neurochemistry* 21,759-73.
- Okamura N., Stoskopf M., Yamaguchi H., Kishimoto Y.** (1985) Lipid composition of the nervous system of earthworms (*Lumbricus terrestris*). *The Journal of Neurochemistry* 45,1875-9.
- Okamura N., Yamaguchi H., Stoskopf M., Kishimoto Y., Saida T.** (1986) Isolation and characterization of multilayered sheath membrane rich in glucocerebroside from shrimp ventral nerve. *The Journal of Neurochemistry* 47,1111-6.
- Popot J.L., Pham Dinh D., Dautigny A.** (1991) Major myelin proteolipid: the 4-alpha-helix topology. *The Journal of Membrane Biology* 120, 233-46
- Rasband M.N.** (2008) Na<sup>+</sup> channels get anchored...with a little help. *The Journal of Cell Biology* 183,975-7.

**Roots B.I., Cardone B., Pereyra P.** (1991) Isolation and characterization of the myelin-like membranes ensheathing giant axons in the earthworm nerve cord. *Annals of the New York Academy of Sciences* 633,559-61.

**Roots B.I., Lane N.J.** (1983) Myelinating glia of earthworm giant axons: thermally induced intramembranous changes. *Tissue & Cell* 15, 695-709.

**Rosenbluth J.** (1999) A brief history of myelinated nerve fibers: one hundred and fifty years of controversy. *The Journal of Neurocytology* 28,251-62.

**Roth A.D., Ivanova A., Colman D.R.** (2006) New observations on the compact myelin proteome. *Neuron and Glia Biology* 2,15-21.

**Schweigreiter R., Roots B.I., Bandtlow C.E., Gould R.M.** (2006) Understanding myelination through studying its evolution. *International Review of Neurobiology* 73,219-73

**Sorenson M.M.** (1973) The free amino acids in peripheral nerves and in isolated inhibitory and excitatory nerve fibres of Cancer magister. *The Journal of Neurochemistry* 20,1231-45.

**Stecca B., Southwood C.M., Gragerov A., Kelley K.A., Friedrich V.L. Jr, Gow A.** (2000) The evolution of lipophilin genes from invertebrates to tetrapods: DM-20 cannot replace proteolipid protein in CNS myelin. *The Journal of Neuroscience* 20,4002-10.

**Shapiro L., Love J., Colman D.R.** (2007) Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annual Review of Neuroscience* 30,451-74.

**Shimomura K., Hanjura S., Ki P.F., Kishimoto Y.** (1983) An unusual glucocerebroside in the crustacean nervous system. *Science* 220,1392-3.

**Simons M., Krämer E.M., Thiele C., Stoffel W., Trotter J.** (2000) Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *The Journal of Cell Biology* 151,143-54.

**Sims N.R.** (1990) Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *The Journal of Neurochemistry* 55,698-707.

**Taylor C.M., Marta C.B., Claycomb R.J., Han D.K., Rasband M.N., Coetzee T., Pfeiffer S.E.** (2004) Proteomic mapping provides powerful insights into functional myelin biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101,4643-8.

**Weatherby T.M., Davis A.D., Hartline D.K., Lenz P.H.** (2000) The need for speed. II. Myelin in calanoid copepods. *The Journal of Comparative Physiology* 186,347-57.

**Waehnelde T.V., Malotka J., Kitamura S., Kishimoto Y.** (1989) Electrophoretic characterization and immunoblot analysis of the proteins from the myelin-like light membrane fraction of shrimp ventral nerve (*Penaeus duorarum*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 92,369-74.

**Washburn M.P., Wolters D., Yates J.R. 3rd.** (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* 19,242-7.

**Werner H., Dimou L., Klugmann M., Pfeiffer S., Nave K.A.** (2001) Multiple splice isoforms of proteolipid M6B in neurons and oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience* 18,593-605.

**Xu K., Terakawa S.** (1999) Fenestration nodes and the wide submyelinic space form the basis for the unusually fast impulse conduction of shrimp myelinated axons. *The Journal of Experimental Biology* 202,1979-89.

**Yamaguchi Y., Ikenaka K., Niinobe M., Yamada H., Mikoshiba K.** (1996) Myelin proteolipid protein (PLP), but not DM-20, is an inositol hexakisphosphate-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 271,27838-46.

**Yoshida M., Colman D.R.** (1996) Parallel evolution and coexpression of the proteolipid proteins and protein zero in vertebrate myelin. *Neuron* 16,1115-26.

**Zalc B. and Colman D.R.** (2000) Origin of vertebrate success. *Science* 288, 271–272.

## FIGURE LEGENDS AND TABLE CAPTION

### **Figure 1: Myelin-enriched fraction isolated from *L. vannamei* nerve cord.**

Electron micrographs of the subcellular fraction isolated from shrimp nerve cords showing multilayered membranes with alternation of major and minor dense lines typical of compact myelin.

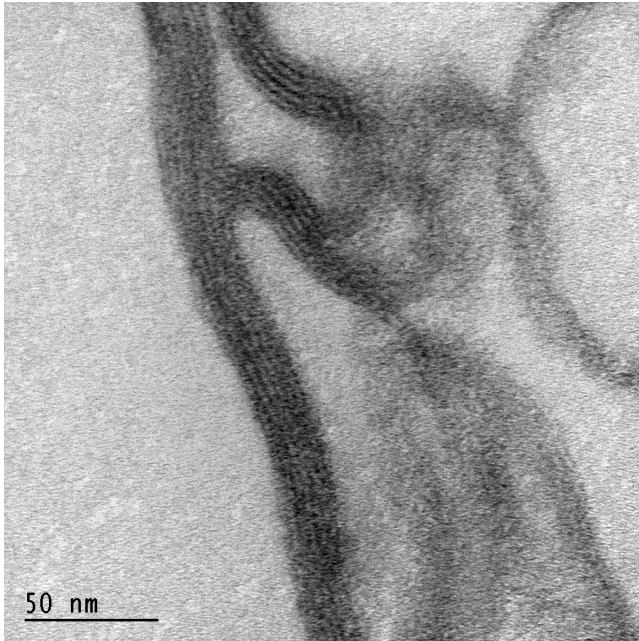
**Figure 2: Proteomic analysis.** Functional and cellular localization profile of MudPIT-identified proteins

### **Table 1. Protein identification summary**

**Figure 3:** Alignment of the PLP and M6 amino acid sequences of the N-terminal region from species known to have (*Homo sapiens*, *Macaca mullata*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*) and to lack myelin (*Drosophila melanogaster*) with a peptide from *Litopenaeus vannamei*.

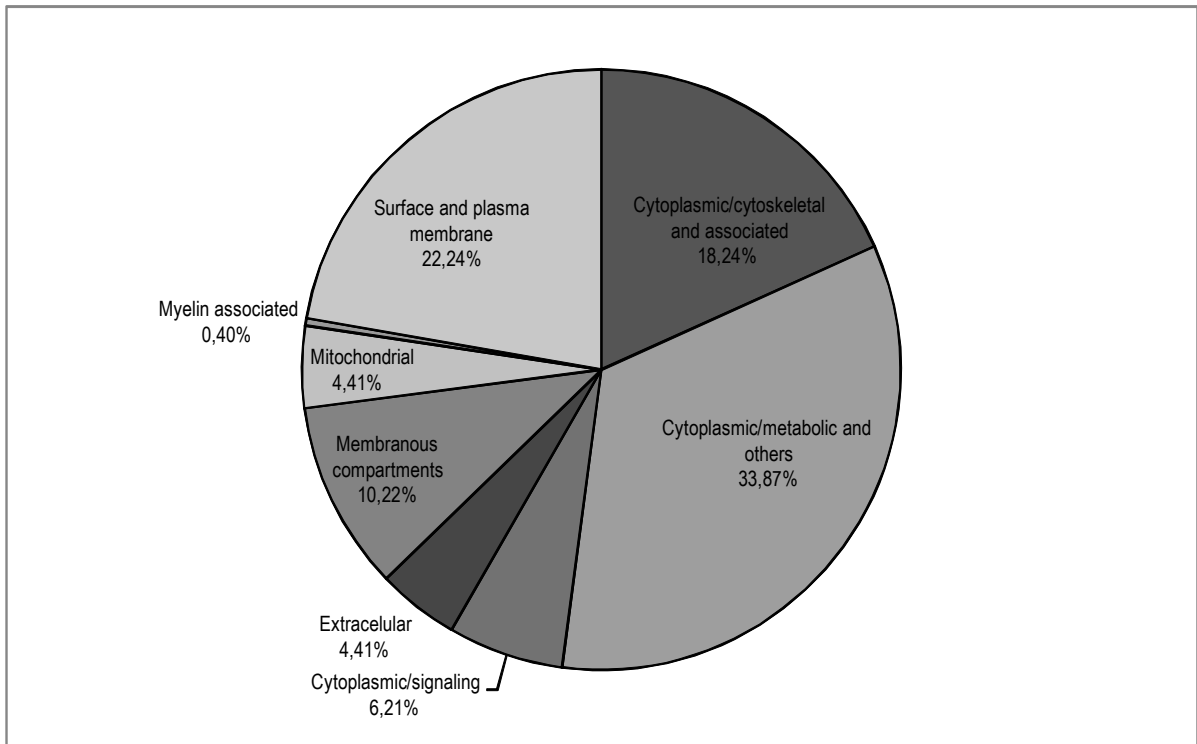
**Figure 4: PLP Topology.** Topology of human PLP indicating similarity at proteomic or genomic level to *L. vannamei*. Circles represent PLP sequence as follows: Black circles indicate >95%, dark grey circles >80% and light grey  $\leq$  50% similarity to human PLP amino acid sequence found using MudPit data. The intracellular loops circled with a black line indicate > 95% similarity to the human *PLP* genomic sequence.

**Figure 1: Myelin-enriched fraction isolated from *L. vannamei* nerve cord**



Electron micrographs of the subcellular fraction isolated from shrimp nerve cords showing multilayered membranes with alternation of major and minor dense lines typical of compact myelin.

**Figure 2: Proteomic analysis**



**Table 1. Protein identification summary**

<b>Protein name and function Detected using Mascot (*) and Blast (#)</b>		<b>Total of peptides detected</b>
<b><i>Myelin associated</i></b>		
#	Myelin proteolipid protein	2
<b><i>Surface and plasma membrane</i></b>		
*#	ATPase, H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> exchanging, alpha polypeptide	9
*#	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide	16
#	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 2 (+) polypeptide	8
#	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 3 polypeptide	3
#	glutamate receptor, ionotropic	2
*#	immunoglobulin heavy chain	21
#	N-CAM	2
<b><i>Membranous compartments</i></b>		
#	syntaxin binding protein 1	2
#	synaptobrevin family	2
#	synapse protein	3
<b><i>Cytoplasmic/cytoskeletal and associated</i></b>		
*#	actin alpha	16
#	actin beta related pseudogene	2
*#	actin, beta	30
#	actin, beta-like 3	8
#	actinin, alpha 1	2
#	actinin, alpha 3	3
*	actinin, alpha 4	3
#	actin-like protein	5
#	ankyrin	2
*#	dynein, axonemal, heavy chain	10
#	dynein, cytoplasmic 1, heavy chain	4
*#	Cytokeratin	13
#	myosin ID	2
#	Myosin, heavy chain 10, non-muscle	2
*#	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	14
*#	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	12
*#	tubulin, alpha-	116
*#	tubulin, beta	164
<b><i>Cytoplasmic/signaling</i></b>		
*	Ywhae-prov protien (14-3-3 protein)	4
*#	G protein guanine nucleotide binding protein	18
#	RAB6C, member RAS oncogene family	2
#	RAB9B, member RAS oncogene family	2
#	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	3
#	RAP1B, member of RAS oncogene family	2
<b><i>Cytoplasmic/metabolic and others</i></b>		
#	aldolase C, fructose-bisphosphate	2
#	acyl-CoA synthetase	2
#	creatine kinase, brain	2
*#	enolase 2 (gamma, neuronal)	4
#	eukaryotic translation elongation factor 1 ( <i>expressed in the brain</i> )	6
#	heat shock 70kDa protein 1A	2

#	heat shock 70kDa protein 1-like	5
#	heat shock 70kDa protein 2	2
#	heat shock 70kDa protein 8	4
#	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A	3
	kinesin family member 5C ( <i>neuron specific</i> )	2
<b>Mitochondrial</b>		
*#	mitochondrial ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting F1 complex beta subunit	6
#	cytochrome c oxidase subunit 1	3
#	cytochrome c oxidase subunit II	2
*#	cytochrome P450	8
#	NADH dehydrogenase subunit 4	2
#	solute carrier family 25	7
<b>Extracellular</b>		
*	Hemocyanin	59

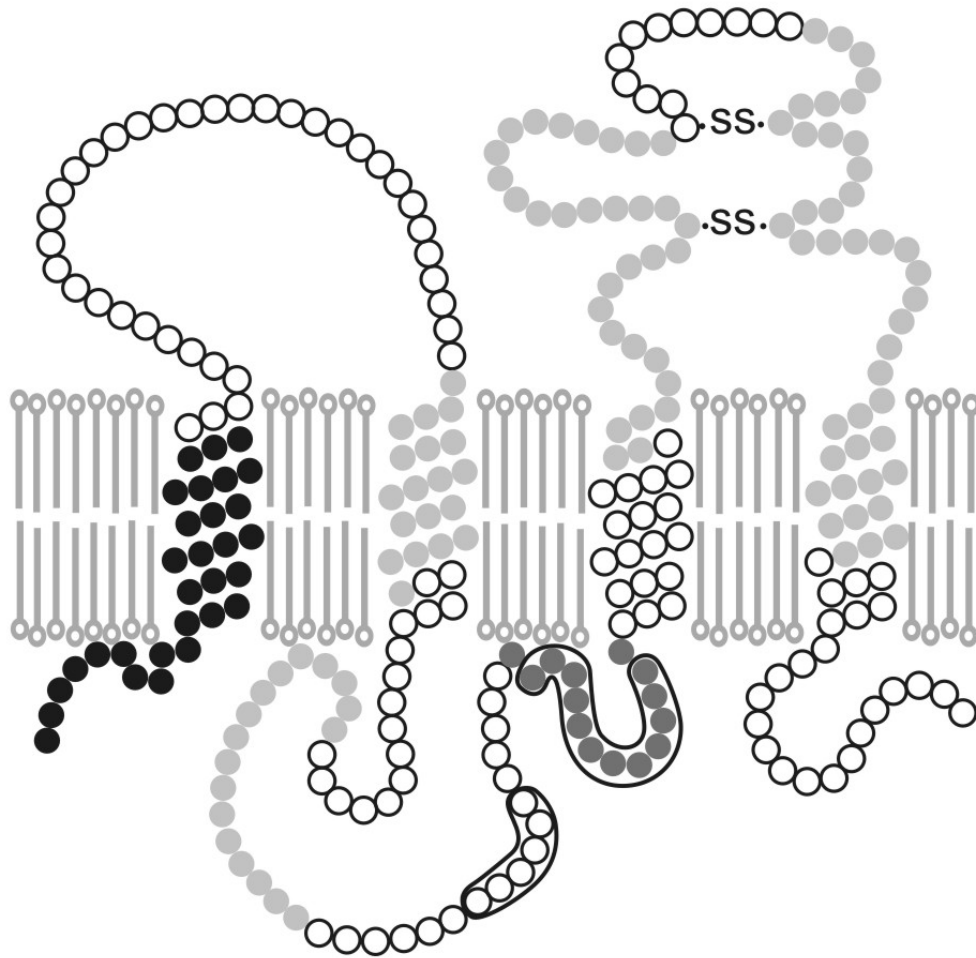


**Figure 3:**

PLP <i>Homo sapiens</i> P60201.2	M	G	L	L	E	C	C	A	R	C	L	V	G	A	P	F	A	S	L	V	A	T	G	L	C	F	F	G	V	A	L	F	C
PLP <i>Macaca mullata</i> XP001088537.1	H	G	L	L	E	C	C	A	R	C	L	V	G	A	P	F	A	S	L	V	A	T	G	L	C	F	F	G	V	A	L	F	C
PLP <i>Mus musculus</i> NP035253.1	M	G	L	L	E	C	C	A	R	C	L	V	G	A	P	F	A	S	L	V	A	T	G	L	C	F	F	G	V	A	L	F	C
PLP <i>Gallus gallus</i> P23289.2	M	G	L	L	E	C	C	A	R	C	L	V	G	A	P	F	A	S	L	V	A	T	G	L	C	F	F	G	V	A	L	F	C
<i>Litopenaeus vannamei</i>	-	G	L	L	E	C	C	A	R	C	L	V	G	A	P	F	A	S	L	V	A	T	G	L	X	F	F	G	V	A	L	F	G
M6 <i>Drosophila melanogaster</i> AAF56553.1	M	G	-	-	E	C	C	Q	S	C	M	A	R	I	P	Y	A	T	L	I	A	T	L	M	C	L	L	G	V	G	I	F	C
M6 <i>Homo sapiens</i> BAA08712.1	K	G	C	F	E	C	C	I	K	C	L	G	G	I	P	Y	A	S	L	I	A	T	I	L	L	Y	A	G	V	A	L	F	C

Alignment of the PLP and M6 amino acid sequences of the N-terminal region from species know to have and lack myelin. The alignment is coded by the residues background in a grayscale according to amino acids family.

**Figure 4:**



Topology of human PLP indicating similarity at proteomic or genomic level to *L. vannamei*. Circles represent PLP sequence as follows: Black circles indicate >95%, dark grey circles >80% and light grey  $\leq$  50% similarity to human PLP amino acid sequence found using MudPit data. The intracellular loops circled with a black line indicated > 95% similarity to the human PLP genomic sequence.

## **CAPÍTULO 3**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O conceito preponderantemente aceito de mielina a considerava uma inovação evolutiva exclusiva dos vertebrados com mandíbulas (Zalc, 2006), mas a identificação de estruturas morfológicamente similares à mielina em grupos independentes de invertebrados como anelídeos e crustáceos têm desafiado este dogma. Apesar de estas estruturas terem sua morfologia bem descrita (revisado em Hartline e Colman, 2007), faltam trabalhos que as descrevam sob ponto de vista molecular, o que é de suma importância para o entendimento das relações de ancestralidade de seus componentes e da forma como esta estrutura surgiu e evoluiu.

Dentre os crustáceos, observa-se a presença de mielina nos camarões da família Penaeidae, entre outros grupos. A mielina destes animais difere em termos estruturais daquela dos vertebrados por apresentar-se concêntrica e envolver uma organização celular única com tipos celulares adicionais e nodos fenestrados o que parece resultar nas altas velocidades de transmissão nervosa descritas em animais deste grupo (Xu e Terakawa, 1999). O axônio é envolvido por uma célula adicional de provável origem glial cujo citoplasma é preenchido por microtúbulos separada da célula mielinizante por um espaço submielínico, propiciando um isolamento eficiente das superfícies axonais (Govind e Pearce, 1988; Xu e Terakawa, 1999).

Adicionalmente, invertebrados de modo geral apresentam alto potencial regenerativo, mesmo aqueles taxa portadores de uma bainha de mielina (Anderson et al, 1980 e Dinsmore, 2008), levando a necessidade de estudar tal estrutura, comparando seus componentes com os já conhecidos presentes na mielina dos vertebrados, o que pode servir de base para posteriores estudos relacionados à regeneração nos vertebrados.

O surgimento de novas tecnologias de análise proteômica permitiu a caracterização de proteínas que não eram possíveis com as técnicas proteômicas mais tradicionais. Já nas metodologias mais atuais, como o MudPit, consegue-se a detecção de proteínas com alta carga, hidrofóbicas e transmembranas, o que torna estas técnicas de suma importância para a análise dos componentes protéicos da mielina, já que grande parte das suas proteínas apresentam estas características (Washburn et al., 2001; Taylor et al., 2004; Roth et al., 2006).

Os resultados apresentados neste trabalho tiveram como objetivo caracterizar os constituintes protéicos presentes na mielina do camarão *L. vannamei*. Para isto, foi utilizado um protocolo de subfracionamento celular para isolar a mielina do cordão nervoso ventral destes animais. Através do MudPit, observou-se, nesta fração, a presença de proteínas típicas de sistema nervoso, algumas que ainda não haviam sido descritas nestes animais. Encontrou-se, também, seqüências com alta similaridade aos membros da família das lipofilinas, especialmente com a região N-terminal da PLP, uma das mais abundantes na mielina de tetrápodes e de grande importância para sua correta manutenção. Seqüências relacionadas a esta proteína também foram encontradas no banco de dados do projeto genoma do camarão, apesar deste ainda se encontrar incompleto. Esta família de proteínas é encontrada tanto em animais mielinizados quanto nos não mielinizados (Möbius et al., 2008). A presença de seqüências relacionadas à esta família, com maior similaridade com a PLP do que com a lipofilina encontrada em invertebrados, chamada M6, pode indicar que proteínas similares a PLP evoluíram independente e paralelamente nos animais mielinizados.

Além das análises incluídas no manuscrito, em dados complementares (Apêndice) foi observado, através de imunohistoquímica a ligação de um anticorpo capaz de reconhecer as duas isoformas da glicoproteína associada a mielina (MAG)

de mamíferos, uma imunoglobulina presente na mielina destes animais, em cortes congelados de cordão nervoso de *L. vannamei*, com localização semelhante a encontrada em vertebrados. Na análise proteômica, um grande número de seqüências relacionadas à imunoglobulinas foi detectado, refletindo a necessidade de adesões na mielina para garantir suas propriedades isolantes. Estes resultados demonstraram uma ligação específica, que deverá ser explorada em estudos posteriores para confirmar a identidade do antígeno presente na mielina do camarão.

A descrição das proteínas presentes na mielina de *L. vannamei* sugere que a mielina destes animais compartilha componentes com características semelhantes a mielina dos vertebrados, tendo sido observado neste trabalho, a presença de duas proteínas típicas da mielina de tetrápodes. Estes achados podem contribuir para a elucidação do advento da mielina ao longo da evolução, elucidando as relações dos constituintes da mielina dos diferentes taxa. Estudos subseqüentes devem dedicar-se a caracterizar o grande número de peptídeos encontrados na fração e não identificados no presente estudo, podendo levar a identificação de componentes específicos à mielina do camarão relacionados às características únicas encontradas nesta mielina. Os projetos de seqüenciamentos genômicos em andamento serão de grande valia para a complementação deste estudo, visto que diariamente são identificadas novas seqüências. Também são necessários estudos adicionais visando caracterizar a composição proteica dos outros invertebrados mielinizados.

## REFERÊNCIAS

- Anderson H, Edwards JS, Palka J. Developmental neurobiology of invertebrates. *Ann Rev Neurosci.* 1980. Mar;3:97-131.
- Arbas EA, Meinertzhagen IA, Shaw SR. Evolution in Nervous Systems. *Annu Rev Neurosci.* 1991. Mar;14:9-38.
- Bartsch S, Montag D, Schachner M, Bartsch U. Increased number of unmyelinated axons in optic nerves of adult mice deficient in the myelin-associated glycoprotein (MAG). *Brain Res.* 1997. Jul;762(1-2):231-4.
- Bouck A, Vision T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. *Mol Ecol.* 2007 Mar;16(5):907-24.
- Bullock TH, Moore JK, Fields RD. Evolution of myelin sheaths: both lamprey and hagfish lack myelin. *Neurosci Lett.* 1984. Jul;48(2):145-8.
- Cao Z, Qiu J, Domeniconi M, Hou J, Brynson B, Mellado W, Filbin MT. The inhibition site on myelin-associated glycoprotein is within Ig-domain 5 and is distinct from the sialic acid binding site. *J Neurosci.* 2007. Aug;27(34):9146-9154.
- Davis AD, Weatherby TM, Hartline DK, Lenz PH. Myelin-like sheaths in copepod axons. *Nature.* 1999. Apr;398:571.
- Dinsmore CH, ed. A history of regeneration research. USA: Cambridge University Press, 2008.
- Doggenweiler CF, Heuser JE. Ultrastructure of the prawn nerve sheaths. *J Cell Biol.* 1967. Aug;34:407-420.
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron.* 2002. Jul;35(2):283-90.
- Frail DE, Braun PE. Two developmentally regulated messenger RNAs differing in their coding region may exist for the myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem.* 1984. Dec;259(23):14857-62.
- Franzen R, Tanner SL, Dashiell SM, Rottkamp CA, Hammer JA, Quarles RH. Microtubule-associated protein 1B: a neuronal binding partner for myelin-associated glycoprotein. *J Cell Biol.* 2001. Dec;155(6):893-898.
- Freitas PD, Pinheiro AP, Silva TB, Galetti PM. *In silico* analysis of polymorphic microsatellites in penaeid shrimp and construction of a free-access database. *Genet. Mol. Biol.* . 2007.,30(4):1194-1197.
- Fruttiger M, Montag D, Schachner M, Martini R. Crucial role for the myelin-associated glycoprotein in the maintenance of axon-myelin integrity. *Eur J Neurosci.* 1995. Mar;7(3):511-515.

Fujita N, Kemper A, Dupree J, Nakayasu H, Bartsch U, Schachner M, et al. The cytoplasmic domain of the large myelin-associated glycoprotein isoform is needed for proper CNS but not peripheral nervous system myelination. *J Neurosci.* 1998. Mar;18(6):1970-8.

Geren BB, Schmitt FO. The structure of the Schwann cell and its relation to the axon in certain invertebrate nerve fibers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1954. Sep;40(9):863-70

Günther J. Impulse conduction in the myelinated giant fibers of the earthworm. Structure and function of the dorsal nodes in the median giant fiber. *J Comp Neurol.* 1976. Aug;168(4):505-31

Hama K. Some observations on the fine structure of the giant nerve fibers of the earthworm, *Eisenia foetida*. *J Biophysic and Biochem Cytol* 1959. Aug;6(1)61-66.

Hama K. The fine structure of the Schwann cell sheath of the nerve fiber in the shrimp (*Penaeus japonicus*). *J Cell Biol.* 1966. Dec;31(3):624-632.

Hartline DK, Colman DR. Rapid Conduction and the Evolution of Giant Axons and Myelinated Fibers. *Curr Biol.* 2007. Jan;9:29-35.

Harzsch S. Neurophylogeny: Architecture of the nervous system and a fresh view on arthropod phylogeny. *Integr Comp Biol.* 2006. Apr;46(2)162-194.

Heuser JE, Doggenweiler CF. The fine structural organization of nerve fibers, sheaths, and glial cells in the prawn, *Palaemonetes vulgaris*. *J Cell Biol.* 1966. Aug;30:381-403.

Heuser JE, Doggenweiler CF. The fine structural organization of nerve fibers, sheaths, and glial cells in the prawn, *Palaemonetes vulgaris*. *J Cell Biol.* 1966. Aug;30:381-403.

Hudson LD, Proteolipid protein gene In: Lazzarini RA editor, *Myelin biology and disorders, USA: Elsevier Science; 2004, p. 401–420.*

Johnson PW, Abramow-Newerly W, Seilheimer B, Sadoul R, Tropak MB, Arquint M, et al. Recombinant myelin-associated glycoprotein confers neural adhesion and neurite outgrowth function. *Neuron.* 1989. Sep;3(3):377-85.

Kelm S, Pelz A, Schauer R, Filbin MT, Tang S, de Bellard ME, et al. Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol.* 1994. Nov;4(11):965-72.

Kirchhoff F, Hofer HW, Schachner M. Myelin-associated glycoprotein is phosphorylated by protein kinase C. *J Neurosci Res.* 1993. Nov;36(4):368-81

Kirchhoff F, Ohlemeyer C, Kettenmann H. Expression of myelin-associated glycoprotein transcripts in murine oligodendrocytes. *Neurosci.* 1997. May;78(2):561-570.



- Kitagawa K, Sinoway MP, Yang C, Gould RM, Colman DR. A proteolipid protein gene family: expression in sharks and rays and possible evolution from an ancestral gene encoding a pore-forming polypeptide. *Neuron*. 1993 Sep;11(3):433-48.
- Kursula P. Structural properties of proteins specific to the myelin sheath. *Amino Acids*. 2008. Feb;34(2):175-185.
- Kusano K, LaVail MM. Impulse conduction in the shrimp medullated giant fiber with special reference to the structure of functionally excitable areas. *J Comp Neurol*. 1971 Aug;142(4):481-94
- Kusano, K. Electrical activity and structural correlates of giant nerve fibers in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *J. Cell. Physiol*. 1966. Sep:68:361-384.
- Lehmann F, Gäthje H, Kelm S, Dietz F. Evolution of sialic acid-binding proteins: molecular cloning and expression of fish siglec-4. *Glycobiology*. 2004. Nov;14(11):959-968.
- Li C, Trapp B, Ludwin S, Peterson A, Roder J. Myelin associated glycoprotein modulates glia-axon contact in vivo. *J Neurosci Res*. 1998. Jan;51(2):210-7
- Liu BP, Fournier A, GrandPré T, Strittmatter SM. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*. 2002 Aug 16;297(5584):1190-3.
- Matsuda Y, Okitsu A, Sato S, Koito H, Yamamoto H. Soluble myelin-associated glycoprotein-immunoglobulin G1 chimera protein promotes neurite outgrowth from mouse cerebellar neurons. *Neurosci Lett*. 1996. Feb;205(2):87-90.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*. 1994 Oct;13(4):805-11.
- Mehta NR, Lopez PHH, Vyas AA, Schnaar RL. Gangliosides and Nogo receptors independently mediate Myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *J Biol Chem*. 2007 Sep;282(38):27875-27886.
- Möbius W, Patzig J, Nave KA, Werner HB Phylogeny of proteolipid proteins: divergence, constraints, and the evolution of novel functions in myelination and neuroprotection. *Neuron Glia Biol* 2008. 4:111-27.
- Montag D, Giese KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Blüthmann H, et al. Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron*. 1994 Jul;13(1):229-46.
- Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*. 1994. Sep;13(3):757-767.
- Norton WT, Poduslo SE. Myelination in rat brain: Method of myelin isolation. *J Neurochem*. 1973. Oct;21(4):749-757.

- Owens GF, Bunge RP. Evidence for an early role for myelin-associated glycoprotein in the process of myelination. *Glia*. 1989. 2(2):119-128.
- Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, et al. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: Neuropathology and behavioral deficits in single- and Double-null mice. *Exp Neurol*. 2005. Sep;195(1):208-217.
- Pedraza L, Frey AB, Hempstead BL, Colman DR, Salzer JL. Differential expression of MAG isoforms during development. *J Neurosci Res*. 1991 Jun;29(2):141-8.
- Quarles RH, Everly JL, Brady RO. Evidence for the close association of a glycoprotein with myelin in rat brain. *J Neurochem*. 1973. Nov;21(5):1177-1191.
- Quarles RH. Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2002. Nov;59(11):1851-1871.
- Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J Neurochem*. 2007. Mar;100(6):1431-1448.
- Roots BI, Cardone B, Pereya P. Isolation and characterization of the myelin-like membranes ensheathing giant axons in the earthworm nerve cord. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;633:559-61.
- Rosenbluth J. A brief history of myelinated nerve fibers: one hundred and fifty years of controversy. *J Neurocytol* 1996. 28,251-62.
- Roth AD, Ivanova A, Colman DR New observations on the compact myelin proteome. *Neuron Glia Biol* 2006. 2,15-21.
- Rummier LS, Dinh PT, Gupta R. The Anatomy and Biochemistry of Myelin and Myelination. *Oper Tech Orthop*. 2004. Jul;14:146-152.
- Salzer JL, Holmes WP, Colman DR. The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: Homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J Cell Biol*. Apr;104:957-965.
- Schweigreiter R, Roots BI, Bandtlow CE, Gould RM. Understanding myelination through studying its evolution. *Int Rev Neurobiol*. 2006. 73,219-73
- Shimomura K, Hanjura S, Kin PF, Kishimoto Y. An unusual glucocerebroside in the crustacean nervous system. *Science*. 1983. Jun;220:1392-1394.
- Sousa AD, Bhat MA. Cytoskeletal transition at the paranodes: the Achilles' heel of myelinated axons. *Neuron Glia Biol*. 2007 May;3(2):169-178.
- Spörkel O, Uschkureit T, Büssow H, Stoffel W. Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: myelination and development *Glia*. 2002 Jan;37(1):19-30.

- Stecca B, Southwood CM, Gragerov A, Kelley KA, Friedrich VL Jr, Gow A. The evolution of lipophilin genes from invertebrates to tetrapods: DM-20 cannot replace proteolipid protein in CNS myelin. *J Neurosci* 2000;20:4002-10.
- Tang S, Woodhall RW, Shen YJ, deBellard ME, Saffell JL, Doherty P, et al. Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci*. 1997. Sep;9(5-6):333-46.
- Taylor CM, Marta CB, Claycomb RJ, Han DK, Rasband MN, Coetzee T, Pfeiffer SE. Proteomic mapping provides powerful insights into functional myelin biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4643-8.
- Trapp BD, Kidd GJ. Structure of the myelinated axon. In: Lazzarini RA editor. *Myelin Biology and disorders*. USA: Elsevier Science; 2004. p. 3-27.
- Trapp BD, Pfeiffer SE, Anitei M, Kidd GJ. Cell biology of myelin assembly. In Lazzarini RA editor. *Myelin Biology and disorders*. USA: Elsevier Science; 2004. p. 29-55.
- Turnley AM, Bartlett PF. MAG and MOG enhance neurite outgrowth of embryonic mouse spinal cord neurons. *Neuroreport*. 1998 Jun 22;9(9):1987-90.
- Venkatesh B, Erdmann MV, Brenner S. Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001;98:11382–11387.
- Vinson M, Raush O, Maycox PR, Prinjha RB, Chapman D, Morrow R, et al. Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2002. Mar;22(3):344-352.
- Volpicelli-Daley LA, Levey A. Immunohistochemical localization of proteins in the nervous system. In: Crawley JN et al. *Current Protocols in Neuroscience*. USA: John Wiley & Sons; 2004. Chapter 1: Unit 1.2
- Vyas AA, Patel HV, Fromholt SE, Heffer-Laue M, Vyas KA, Dang J, et al. Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. Jun;99(12):8412-8417.
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotech*. 2001 19:242-7.
- Waxman SG, Bangalore L. Electrophysiologic consequences of myelination. In: Lazzarini RA. *Myelin Biology and disorders*. USA: Elsevier Science; 2004. p. 117-141.
- Weatherby TM, Davis AD, Hartline DK, Lenz PH. The need for speed II. Myelin in calanoid copepods. *J Comp Physiol A*. 2000. Apr;186(4):347-357.
- Weimbs T, Stoffel W. Proteolipid protein (PLP) of CNS myelin: positions of free, disulfide-bonded, and fatty acid thioester-linked cysteine residues and implications for the membrane topology of PLP. *Biochemistry*. 1992. Dec;31(49):12289-96.

Weiss MD, Hammer J, Quarles RH. Oligodendrocyte in aging mice lacking myelin-associated glycoprotein are dystrophic but not apoptotic. *J Neurosci Res*. 2000. Dec;62(6):772-780.

Weiss MD, Luciano CA, Quarles RH. Nerve conduction abnormalities in aging mice deficient for myelin-associated glycoprotein. *Muscle Nerve*. 2001. Oct;24(10):1380-1387.

Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Möbius W, Guarente L, Casaccia-Bonnel P, Jahn O, Nave KA. Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci*. 2007. Jul;27(29):7717-30.

Xu K, Terakawa S. Fenestration nodes and the wide submyelinic space form the basis for the unusually fast impulse conduction of shrimp myelinated axons. *J Exp Biol*. 1999. Aug;202(Pt15):1979-1989.

Yamaguchi Y, Ikenaka K, Niinobe M, Yamada H, Mikoshiba K Myelin proteolipid protein (PLP), but not DM-20, is an inositol hexakisphosphate-binding protein. *J Biol Chem*. 1996. 271,27838-46.

Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VM, Li C, et al. Myelin-Associated Glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci*. 1998. Mar;18(6):1953-1963.

Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VM, Li C, et al. Myelin-Associated Glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci*. 1998. Mar;18(6):1953-1963.

Yoshida M, Colman DR Parallel evolution and coexpression of the proteolipid proteins and protein zero in vertebrate myelin. *Neuron*. 1996. 16:1115-26.

Zalc B. The acquisition of myelin: a success story. *Novartis Found Symp*. 2006. 276(12):15-21.

## **APÊNDICE**

### **REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA UTILIZANDO ANTI-MAG**

## Detecção de MAG por imunohistoquímica

### Metodologia

Foram utilizados cordões nervosos ventrais crioconservados, obtidos na Estação Marinha de Aqüicultura da FURG, fixados em paraformaldeído e sacarose. As amostras foram congeladas em gelo seco e armazenadas em freezer -80° C. Realizaram-se cortes de 12µm de espessura em criostato que foram submetidos à imunohistoquímica.

O protocolo de imunohistoquímica seguiu as instruções do fabricante do kit para imunohistoquímica Histostain (Invitrogen). Foi utilizado o anticorpo anti-MAG (Invitrogen) que detecta ambas isoformas que foi gerado contra proteína de vertebrados uma vez que não há equivalente comercial para a de invertebrados. Utilizou-se cromógeno DAB (Zimed) para a detecção.

## Resultados

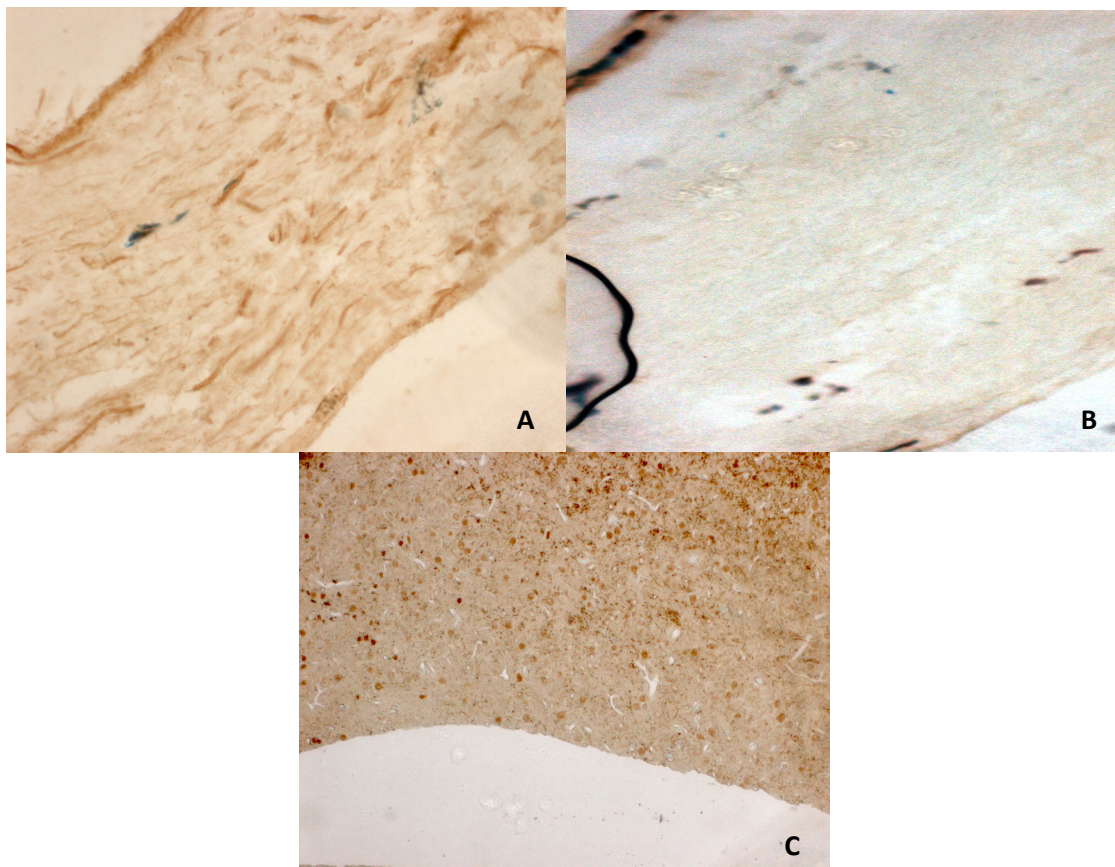


Figura 6. Corte transversal de cordão nervoso de camarão, (A) marcado com anticorpo anti-MAG, (B) controle negativo. (C) Corte longitudinal de encéfalo de rato marcado com anticorpo anti-MAG (controle positivo). Aumento 40X.

## **ANEXO I**

### **COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO**



**Preview (NGB-10-01-0075)**

**From:** fields@helix.nih.gov

**To:** monica.vianna@puhrs.br

**CC:**

**Subject:** Neuron Glia Biology - Manuscript ID NGB-10-01-0075

**Body:** 21-Jan-2010

Dear Prof. Vianna:

Your manuscript entitled "Large-scale molecular analysis of an invertebrate myelin: Litopenaeus vannamei myelin enriched-fraction proteomic characterization" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Neuron Glia Biology.

Your manuscript ID is NGB-10-01-0075.


Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/ngb> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/ngb> .

Thank you for submitting your manuscript to the Neuron Glia Biology.

Sincerely,  
Neuron Glia Biology Editorial Office

**Date Sent:** 21-Jan-2010

 Close Window