



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

**Učení a paměť u transgenních potkanů se
sníženou expresí proteinu Nogo-A**

Mgr. Tomáš Petrásek

Praha, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Studijní obor:	Neurovědy
Předseda oborové rady:	Prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.
Školící pracoviště:	Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i. Oddělení neurofyzologie paměti
Autor:	Mgr. Tomáš Petrásek
Školitel:	Doc. RNDr. Aleš Stuchlík, PhD.
Oponenti:	Prof. MUDr. Richard Rokyta, DrSc. Doc. MUDr. Petr Zach, PhD.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

1. Abstrakt	4
2. Abstract	5
3. Úvod	6
4. Cíle práce a hypotézy	8
5. Metodika	9
6. Výsledky	13
7. Diskuse	18
8. Závěr	22
9. Použitá literatura	23
10. Seznam publikací autora	26

1. Abstrakt

Protein Nogo-A patří k nejvýznamnějším regulačním molekulám v centrální nervové soustavě. Pomáhá řídit vývoj neuronů i glií, navádění axonů i synaptickou plasticitu v dospělém mozku. Ačkoli je studován převážně jako inhibitor regenerace axonů po poranění CNS, hraje roli v celé řadě chorob, včetně neurodegenerativních a neuropsychiatrických.

Tato práce nabízí přehled dosavadních poznatků o funkci Nogo-A a s ním spojených proteinů, a shrnuje výsledky experimentů zaměřených na studium chování v modelu transgenního potkana se sníženou expresí Nogo-A. K hlavním výsledkům patří významné zhoršení výkonnosti v kolotočovém bludišti, ukazující na deficit kognitivní koordinace a flexibility, zatímco řada dalších kognitivních funkcí, jako je prostorová navigace a prostorová i neprostorová paměť, není sníženou expresí Nogo-A ovlivněna. Tato zjištění jsou diskutována v kontextu hypotézy o možném spojení mezi mutacemi či změnami exprese Nogo-A a lidské schizofrenie. Usuzujeme, že potkani se sníženou expresí Nogo-A představují velmi nadějný animální model schizofrenie, který si zasluhuje další výzkum.

Klíčová slova

Nogo-A; kolotočové bludiště, vodní bludiště; prostorová navigace; kognitivní koordinace; prostorové úlohy; transgenní potkan; schizofrenie

2. Abstract

The Nogo-A protein belongs among the most important regulatory molecules in the brain, regulating development of neuronal and glial cells, axon guidance and adult synaptic plasticity. Although it has been studied mainly as an obstacle to axon regeneration after CNS injury, it plays a role in many pathological conditions, including neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. This work offers a literature review of the current knowledge about functions of Nogo-A and related proteins, and then recapitulates the results of experiments focused on the impact on decreased expression of Nogo-A on behavior in a transgenic rat model. The most important finding is that the Carousel Maze performance, tapping higher cognitive functions such as cognitive coordination and cognitive flexibility, is remarkably impaired in this model, while other cognitive functions, such as spatial navigation and both spatial and non-spatial memory are spared in the Nogo-A deficient rats. The results are discussed in the context of a hypothesis linking Nogo-A mutations or abnormal expression to human schizophrenia. We conclude that the Nogo-A deficient rats constitute a very promising animal model of schizophrenia and deserve further attention.

Keywords

Nogo-A; Carousel maze; water maze; spatial navigation, cognitive coordination, spatial tasks, transgenic rat model; schizophrenia

3. Úvod

Protein Nogo-A, řadící se retikulonové rodiny, patří mezi významné inhibitory axonálního růstu asociované s myelinem. Nejčastěji se vyskytuje v myelinových pochvách oligodendrocytů, najdeme jej ale také v některých neuronech (GrandPré a kol., 2000), zejména v oblastech charakteristických vysokou plasticitou. Protein Nogo-A byl původně popsán jako molekula blokující růst a regeneraci nervových vláken po traumatickém poškození CNS (GrandPré a kol., 2000, Schwab, 2004). Blokáda jeho funkce pomocí protilátek a dalších inhibitorů vede u animálních modelů ke zlepšené morfologické i funkční obnově po poranění mozku či míchy (Bregman a kol., 1995, Brösamle a kol., 2000, Fournier a kol., 2002, Fouad a kol., 2004), a vážně se uvažuje i o aplikaci těchto postupů v humánní regenerativní medicíně (Hawryluk a kol., 2008, Zörner a Schwab, 2010, Schmandke a kol., 2014).

Nogo-A je nicméně významný pro celou řadu dalších aspektů fungování CNS, zejména během ontogeneze, kde reguluje procesy jako je migrace a diferenciacie neuronů (Mathis a kol., 2010, Mingorance-Le Meur a kol., 2007), navádění axonů (Schwab a Schnell, 1991) a jejich myelinizace (Pernet a kol., 2008). Především neuronální Nogo-A je také významným regulátorem synaptické plasticity v dospělém mozku (Delekate a kol., 2011, Zagrebelsky a kol., 2010).

Vzhledem k rozmanitým úlohám Nogo-A není tedy zvláště překvapivé, že hraje důležitou roli také v celé řadě patologických procesů, například v patologickém stárnutí a v neurodegenerativních chorobách, jako je Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza nebo amyotrofiická laterální skleróza (Schmandke a kol., 2014).

Tato dizertační práce je zaměřena na možnou spojitost s další závažnou chorobou CNS, a to se schizofrenií. Schizofrenie je neuropsychiatrické onemocnění neurovývojového původu, a existuje hypotéza, že narušení signalizace přes Nogo-A by mohlo hrát roli v její patogenezi. Řada genomových vazebných studií naznačuje spojitost mezi mutacemi či vzácnými alelami genů kódujících proteiny Nogo a jejich receptory a některými případy schizofrenie (Willi a Schwab, 2013, Schmandke a kol., 2014). Tuto představu podporují i data z myších transgenních modelů (Willi a kol., 2010).

Zcela nový vhlad do této problematiky nabízí model transgenního potkana se sníženou expresí (knockdown) Nogo-A, který je ústředním tématem experimentální části této dizertační práce. Linie transgenních potkanů byla připravena v rámci mezinárodní spolupráce v ústavech Central

Institute of Mental Health (Mannheim, Německo), Lékařské fakulty Heidelberské univerzity (Heidelberg, Německo), ETH Zürich (Curych, Švýcarsko) a University v Curychu. Příprava transgenu je podrobněji popsána v publikaci Tews a kol. (2013). Potkani představují obecně mnohem lepší animální model kognitivních a sociálních aspektů lidského chování než laboratorní myši. V případě, že by se tedy potvrdila validita tohoto modelu, otevíralo by to široké možnosti jeho využití pro testování nových potenciálních psychofarmak.

4. Cíle práce a hypotézy

Behaviorálně charakterizovat transgenní potkany kmene Sprague-Dawley se sníženou expresí proteinu Nogo-A (linie L2)

Otestovat chování potkanů L2 v kognitivních úlohách, zaměřených na krátkodobou a dlouhodobou paměť, prostorovou navigaci, kognitivní koordinaci a kognitivní flexibilitu (kolotočové bludiště, Morrisovo vodní bludiště, *step-through avoidance*).

Prozkoumat možné senzomotorické a motivační deficity u tohoto modelu (úloha s viditelným ostrůvkem ve vodním bludišti, chůze po laťce, chůze po rotujícím válci, preference sladkého roztoku).

Zhodnotit transgenního potkana se sníženou expresí Nogo-A jako potenciální model schizofrenie

Identifikovat chování odpovídající pozitivním, negativním a kognitivním symptomům schizofrenie, nebo jejich absenci

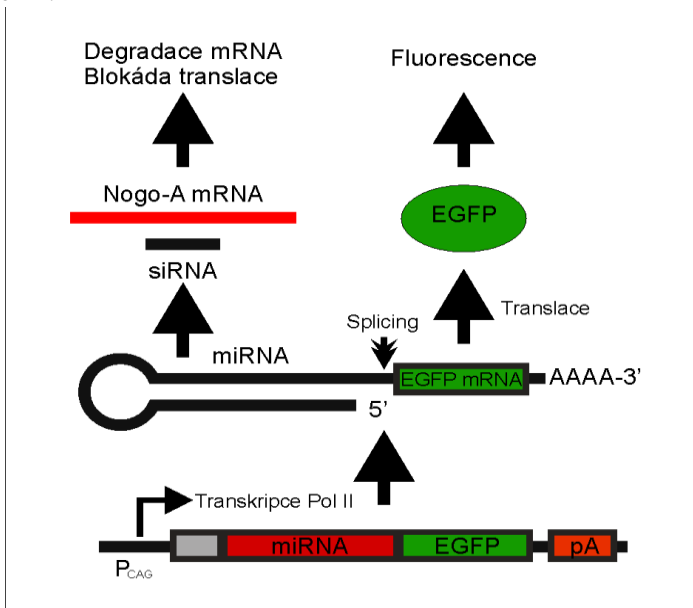
Hypotézy

S ohledem na pozorování publikovaná v literatuře jsme předpokládali přítomnost kognitivních symptomů schizofrenii podobného chování. Očekávali jsme, že kognitivní koordinace a flexibilita bude u potkanů L2 poškozena více než samotná prostorová či neprostorová paměť. Předpokládali jsme také možné projevy hyperlokomoce. Dále jsme u transgenních zvířat očekávali horší pracovní paměť a sníženou citlivost k odměně, ale zachované základní senzomotorické schopnosti.

5. Metodika

Zvířata

Transgenní potkani se sníženou expresí Nogo-A byli vytvořeni na pracovišti Central Institute of Mental Health (CIMH, Mannheim, Německo), ve spolupráci s laboratoří M. Schwaba (ETH Zürich, Švýcarsko). Zakladatelští jedinci kmene Sprague-Dawley pocházeli z chovného zařízení firmy Charles River, Německo. Jedinci použiti v popsáných experimentech pocházeli z transgenní linie 2, dále označované jako L2.



Obr. 1 Transgenní konstrukt

Schéma struktury DNA insertu vloženého do genomu potkanů linie L2, jím exprimované RNA a jejího zpracování na mRNA pro EGFP marker a siRNA blokující translaci Nogo-A vazbou na specifický úsek jeho mRNA.

(Podle Tews a kol., 2013)

Kolotočové bludiště

Kolotočové bludiště má podobu kruhové kovové arény obehnané stěnou z plexiskla. Typickou úlohou v kolotočovém bludišti je vyhýbání se místu. Při ní je v aréně počítačovým sledovacím systémem vymezen zakázaný sektor ve tvaru kruhové výseče. Zakázaný sektor může být definován v referenčním rámci arény nebo místnosti. Vstup do tohoto sektoru je trestán mírnou elektrickou rankou. Sledování pohybu zvířat a arény i udílení elektrického trestu je zajišťováno počítačovým sledovacím programem (Tracker, Biosignal Group, USA).

Úloha vyhýbání se místu může být modifikována tak, aby zvířata měla k dispozici různé zdroje prostorových informací o okolním prostoru: například zhasínáním a rozsvěcením světel, zaplavením arény mělkou vodou či jejím roztočením.

Vyhýbání se místu může být buď pasivní (sektor je definován vzhledem k povrchu arény) anebo aktivní (sektor je definován vzhledem k místnosti, arénka rotuje, nehybné zvíře je tedy do sektoru periodicky zaváženo, a vyhnout se tomu může jen aktivní únikovou reakcí).

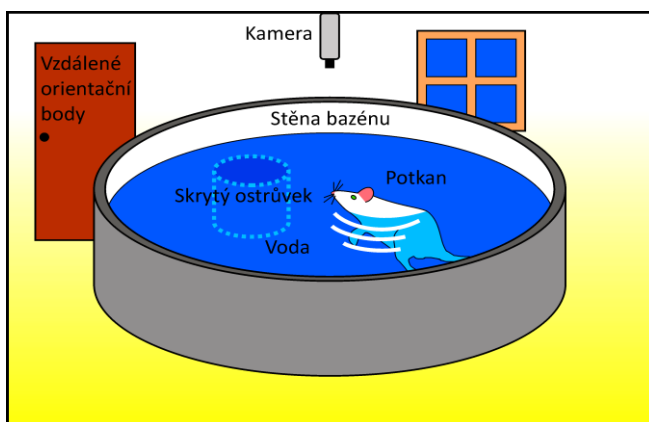
Díky disociaci prostorových rámců je možné navodit situaci, kdy jsou některá vodítka relevantní, zatímco jiná zavádějící. Zvíře v tomto případě musí prostorové rámce odlišovat a posoudit jejich užitečnost. Tento proces je kognitivně náročný a bývá označován jako kognitivní kordinace (Kubik a Fenton, 2005, Lee a kol., 2012, Wesierska a kol., 2005). Přeučení na jinou polohu sektoru (reversal) v úloze aktivního vyhýbání se místu je obecně považováno za ještě náročnější a je testem kognitivní flexibility. Obě tyto funkce bývají narušeny u animálních modelů schizofrenie.

V této práci byla použita sada testů označovaná jako segregáční baterie (Petrasek a kol., 2014a), plně využívající flexibilitu této aparatury, dále také designově jednodušší úloha aktivního vyhýbání se místu s přeučením.

Morrisovo vodní bludiště

Testy v Morrisově vodním bludišti probíhaly v kovové nádrži kruhového tvaru o průměru 180 cm a výšce 50 cm, naplněné vodou o teplotě 20 – 22 °C (obr. 2). Úkolem potkanů bylo nalezení ostrůvku (plošinky) vyrobeného z plexiskla, o průměru 10 cm. Ostrůvek mohl být buď vynořený 1 cm nad hladinu a zvýrazněný tmavým okrajem (viditelný ostrůvek), anebo průhledný a ukrytý 1,5 cm pod hladinou (skrytý ostrůvek).

Úloha se skrytým ostrůvkem testuje prostorovou navigaci ke skrytému cíli s použitím vzdálených orientačních bodů, a prostorovou paměť. Schopnost nalézt ostrůvek je závislá na intaktním hipokampu (Morris a kol., 1982). Úloha s viditelným ostrůvkem slouží jako kontrola, ukazující že zvířata jsou dostatečně motivovaná a fyzicky schopná ostrůvek hledat, a že jsou schopna vnímat optické orientační body.



Obr. 2 Morrisovo vodní bludiště

V kruhovém bazénu je pod hladinou zanořený ostrůvek, který pro testované potkany představuje jedinou možnost úniku. Potkan má za úkol k němu navigovat a pamatovat si jeho pozici s použitím vzdálených orientačních bodů jako vodítek.

Chůze po laťce

Chůze po laťce (*beam walking*) je test motorické koordinace. Potkan je při něm umístěn na vyvýšenou „kladinu“, na jejímž konci se nachází jeho domovská klec, kam se přirozeně snaží dostat. Hodnocen byl čas, počet sklouznutí a počet pádů.

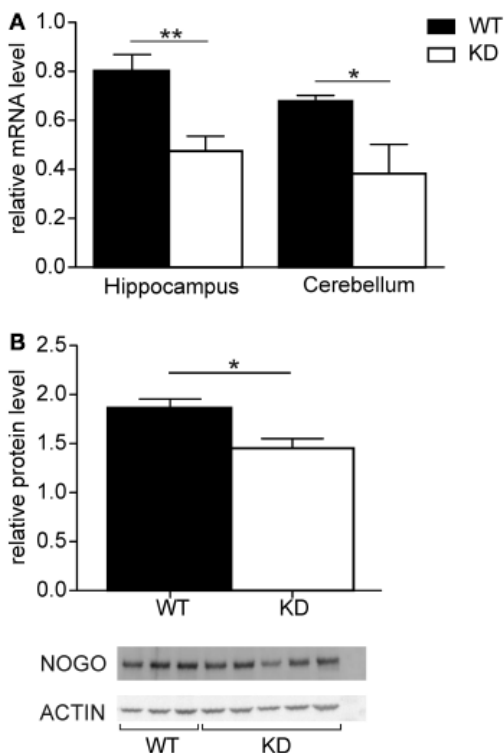
Test pasivního vyhýbání (*step-through avoidance*)

Tato úloha je testem neprostorové dlouhodobé paměti. Aparatura sestává ze dvou oddílů. Jeden z nich je jasně osvětlený, druhý je tmavý. Potkan je vložen do osvětlené části a má přirozenou tendenci vyhledat úkryt v tmavé části. Čas vstupu je zaznamenán experimentátorem.

V habituačních sezeních se potkani seznamovali s aparaturou. Ve třetím sezení (akvizice) jim byl po vstupu do tmavého oddělení udělen elektrický šok. Po 24 hodinách byli vloženi do aparatury znovu (testovací sezení), přičemž prodloužení prodlevy do vstupu do tmavé části by mělo odrážet averzivní vzpomínku z předešlého dne.

6. Výsledky

Ověření validity modelu

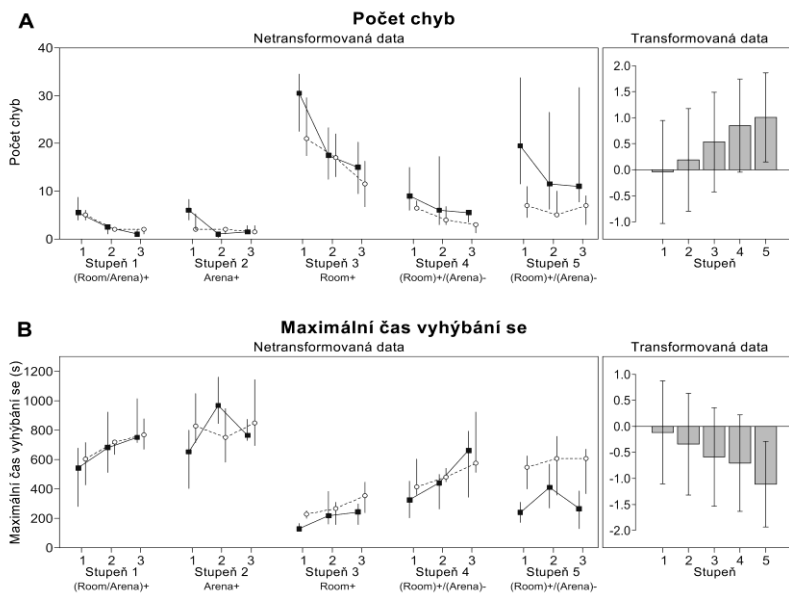


Obr. 3 Stanovení Nogo-A mRNA a proteinu

V hipokampu zvířat použitých v této studii bylo zjištěno snížení množství Nogo-A mRNA na $59,1 \pm 7,5$ % v hipokampu a na $56,4 \pm 17,5$ % v mozečku. Množství proteinu bylo oproti kontrolám sníženo na $77,9 \pm 5,5$ % (Petrasek a kol., 2014b). To ukazuje, že transgenní insert skutečně fungoval. Snížení exprese Nogo-A bylo i po kvantitativní stránce velmi podobné u zvířat používaných v této práci a ve studii Tews a kol. (2013).

Segregační baterie v kolotočovém bludišti

V segregační baterii kolotočového bludiště (viz Petrasek a kol., 2014a) zvířata postupně prošla pěti stupni testování s rostoucími nároky na kognitivní funkce, zejména zpracování referenčních rámců arény a místnosti. Vedle vyhýbání se zakázanému sektoru také sbírala potravní pelety dopadající na dno arény.

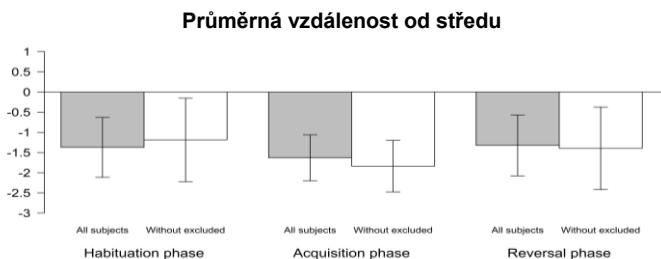


Obr. 4 Výsledky segregační baterie – kognitivní parametry

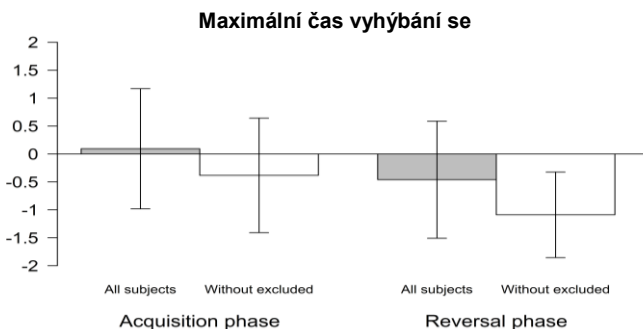
V levých panelech grafu jsou mediány jednotlivých sezení s úsečkami vyznačujícími 1. a 3. kvartil. Vpravo transformovaná data pro jednotlivé stupně (rozdíl mezi průměry skupin s 95% konfidenčními intervaly). Pokud chybová úsečka neprotíná nulu, byl meziskupinový rozdíl v daném stupni signifikantní. Panel A ukazuje počet chyb (vstupů). U skupiny L2 existoval trend k vyššímu počtu chyb ($p = 0,07$) s tendencí k jeho zvyšování v pozdějších stupních ($p = 0,17$). Panel B ukazuje maximální čas vyhýbání se. Skupina L2 byla v tomto parametru signifikantně horší ($p = 0,03$) a opět se postupně zhoršovala, avšak ani v tomto případě nebyla sestupná tendence signifikantní ($p = 0,23$).

Aktivní vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti

Potkani byli v této úloze umístěni na rotující aréně a vyhýbali se sektoru definovanému vzhledem k místnosti. Důležitým rozdílem je, že nebyla přítomna potravní motivace (potkani nesbírali pelety ani nebyli potravně deprivováni).



Obr. 5 Průměrná vzdálenost od středu v úloze aktivního vyhýbání se místu
Potkani se sníženou expresí *Nogo-A* byli v této úloze méně úzkostní, a v průměru se pohybovali blíže středu arény (dále od stěn). Intaktní potkani se více drželi u stěn, a to jak během habituace a reversalu, kdy byl přítomen zakázaný sektor, tak i během habituace, kdy jim žádný trest nehrozil (Petrasek a kol., 2014b).

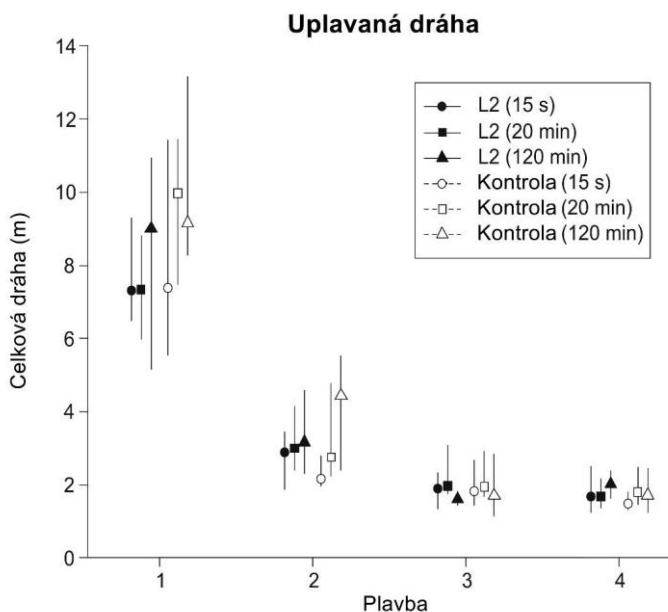


Obr. 6 Maximální čas vyhýbání se v úloze aktivního vyhýbání se místu
Potkani se sníženou expresí *Nogo-A* se významně nelišili při započtení všech zvířat. Při vyloučení problémových jedinců z kontrolní skupiny (kteří strnule seděli a nedokázali úlohu řešit z důvodu přílišné úzkosti) se ukázalo, že L2 potkani si v úloze vedli významně hůře (Petrasek a kol., 2014b).

Morrisovo vodní bludiště

Úloha *delayed-matching-to-place* (O'Carroll a kol., 2006, Steele a Morris, 1999) je test prostorové paměti, který umožňuje studium pracovní paměti a perzistence paměťové stopy osvojené během jediného akvizičního sezení.

Zvířata prodělala 8 denních sezení, se čtyřmi plavbami každý den. Poloha ostrůvku se ze dne na den měnila, takže zvířata musela při první plavbě každého dne ostrůvek najít náhodně a jeho pozici si zapamatovat, aby jej dokázala snáz najít při dalších plavbách. Protože prodleva mezi první a druhou plavbou byla proměnlivá (15 s, 20 min a 2 hod), bylo možné sledovat perzistenci paměťové stopy v čase (Petrasek a kol., 2014a).



Obr. 7 Úloha delayed matching to place ve vodním bludišti

Body reprezentují mediány pro danou plavbu (pro všechna zahrnutá sezení), chybové úsečky rozsah prvního a třetího kvartilu. Mediány byly spočítány z výsledků za sezení 3 – 8, pro plavby 1 – 4 a pro různé délky prodlevy mezi první a druhou plavbou. Pro jednotlivá sezení (dny) byla poloha ostrůvku odlišná. S délkou ITI signifikantně vzrůstala i délka uplavané dráhy, což odráží obtížnější vybavení naučené polohy ostrůvku po delší prodlevě. L2 potkani se však od kontrolních nelišili.

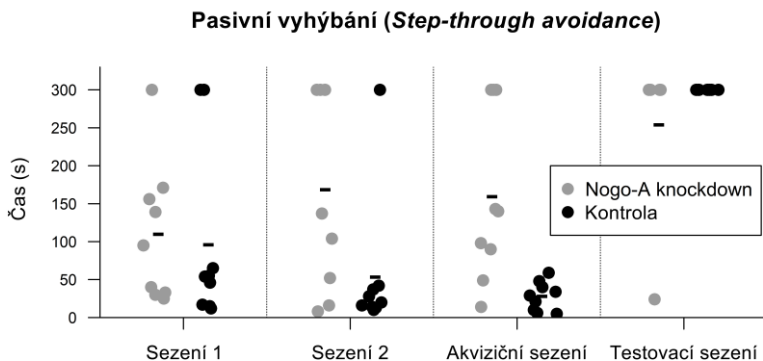
Chůze po latce

V celkovém skóre se skupiny L2 a kontrolní od sebe nelišily. Nelišily se ani v počtu sklouznutí a pádů.

Test pasivního vyhýbání (*Step-through avoidance*)

Výsledky lze shrnout tak, že při první expozici novému prostředí byl čas do vstupu do tmavého oddílu shodný u obou skupin, později u kontrolních zvířat klesal, zatímco u L2 mírně stoupl, rozdíl mezi skupinami měl tedy rostoucí trend. Kontrolní jedinci zjevně preferovali tmavou část aparatury a v následujících sezeních do ní vstupovali stále dříve, naopak u L2 se latence vstupu nijak nezkracovala nebo se dokonce prodlužovala (obr. 8). Můžeme usuzovat, že méně úzkostní potkani linie L2 nebyli natolik motivovaní hledat úkryt v neosvětleném oddílu aparatury.

V testovacím sezení (po předchozí negativní zkušenosti s elektrickým šokem) potkani do tmavého oddílu nevstupovali vůbec (s jedinou výjimkou ve skupině L2), což ukazuje na uchování vzpomínky na nepříjemnou zkušenost.



Obr. 8 Pasivní vyhýbání (*step-through avoidance*)

Body reprezentují latence do vstupu do tmavého kompartmentu pro jednotlivé potkany, černé čárky ukazují polohu průměru. Chování v prvních třech sezeních je spontánní, bez averzivní zkušenosti s tmavým oddílem. Na konci třetího sezení zvířata po vstupu do tmavého kompartmentu dostala elektrickou ránu, další den se mu proto již vyhýbala.

7. Diskuse

Snížená exprese Nogo-A vede ke zhoršené výkonnosti v úlohách kolotočového bludiště

V úloze segregací baterie vykazovali L2 potkani nesignifikantně zvýšenou lokomoci a signifikantní deficit v kognitivních parametrech (počet chyb a maximální čas vyhýbání se, viz obr. 4). Ve všech kognitivních ukazatelích byl deficit skupiny L2 výraznější v pozdějších a kognitivně náročnějších stupních, vyžadujících segregaci prostorových rámců. Jde pouze o trend, neboť tento efekt se neukázal jako statisticky významný, nicméně je pozoruhodný.

Již ve třetím stupni byl konflikt referenčních rámců přítomen – pachové značky na povrchu arény byly sice skryty vodou, nicméně idiothetická navigace (např. integrace dráhy) byla v rozporu s navigací pomocí vzdálenějších vodítek. Ve čtvrtém stupni byl konflikt výraznější (přibyly pachové značky), nicméně poloha zakázaného sektoru vzhledem k místnosti zůstala stejná jako v předešlém. V pátém stupni byla poloha sektoru změněna. Ačkoli testovací podmínky jinak zůstaly stejné, výkonnost skupiny L2 klesla, což ukazuje na deficit kognitivní flexibility.

V úloze aktivního vyhýbání se místu byly kognitivní požadavky velmi podobné posledním dvěma stupňům segregací baterie. Do výsledků se promítla zvýšená anxieta u kontrolní skupiny, která vedla u některých zvířat ke strnulosti a neschopnosti úlohu řešit, což si vyžádalo jejich vyloučení. Lokomoce u obou skupin byla (po vyloučení pasivních jedinců) srovnatelná, skupina L2 si ale vedla významně hůře v kognitivním aspektu úlohy. Toto poškození bylo ještě výraznější během přeučení. I v této úloze se tedy potvrdilo poškození schopnosti segregace prostorových rámců i flexibility chování.

Pozorované rozdíly by bylo možno vysvětlit také nekognitivním postižením. Předpokladem k osvojení úlohy je aktivní pohyb, nedostatečná lokomoce vede k nízkému počtu chyb v úlohách s pasivním vyhýbáním, a naopak k vysokému v aktivním vyhýbání se místu, bez ohledu na kognitivní schopnosti. S výjimkou imobility související s anxiétou (diskutované dále) ale nebyly nalezeny výraznější změny v lokomoci, motorické funkce byly také zcela normální. Vyloučit ovšem nelze deficit pozornosti, který by rovněž mohl vést ke zhoršenému vyhýbání v kolotočovém bludišti.

Celkově vzato výsledky ukázaly, že potkani s uměle sníženou expresí Nogo-A jsou oproti kontrolním jedincům na kolotočovém bludišti kognitivně horší. Protože prostorová navigace a paměť, testovaná ve vodním bludišti, nebyla narušena, jde patrně o specifické poškození schopnosti odděleně posuzovat prostorové rámce. Segregace prostorových rámců je považována za analogii kognitivní koordinace u lidí (Wesierska a kol., 2005), která je specificky narušená u schizofreniků (Phillips a Silverstein, 2003). Podobně je tomu také v případě kognitivní flexibility. Oba tyto deficity ukazují na postižení podobné kognitivním symptomům schizofrenie. Zhoršená kognitivní flexibilita v podmínkách přeučení v prostorové úloze (vodní T-bludiště) byla navíc již zaznamenána u myši (Willi a kol., 2010) i potkanů (Tews a kol., 2013) s potlačenou expresí Nogo-A.

Anxieta v úloze aktivního vyhýbání se místu

V kolotočovém bludišti bez potravní motivace se u řady potkanů, zejména v kontrolní skupině, objevovaly známky zvýšené anxiety, například zvýšená defekace, pohyb podél stěn (thigmotaxe) a dokonce dlouhodobá imobilita. Přetrvávající nehybnost v obdobné úloze již byla u kmene Sprague-Dawley dříve popsána (Carr a kol., 2011), a lze předpokládat, že jde o strnulost (freezing) coby pasivní reakci na ohrožení. U skupiny L2 se takovéto chování objevovalo zřídka.

Protože úloha aktivního vyhýbání se místu vyžaduje aktivní lokomoci, a nehybná zvířata v ní nemohou nijak projevit své kognitivní schopnosti, museli být tito jedinci z analýzy vyloučeni. I po vyloučení pasivně se chovajících zvířat byly zbývající kontroly úzkostnější než jedinci skupiny L2, na což poukazuje výrazná thigmotaxe a vyšší defekace (obr. 5).

Tento rozdíl byl zjevně přítomen ještě před aplikací elektrického trestu, neboť vyšší thigmotaxe a nižší lokomoce u kontrolní skupiny byly pozorovatelné již během habituace, kdy žádné stresující stimuly (vyjma nového prostředí) nebyly přítomny, obdobně se objevil i v habituační fázi úlohy pasivního vyhýbání. Dá se tedy předpokládat, že i rozdíly v četnosti a dlouhodobosti pasivního chování mezi L2 a kontrolami byly podmíněny nižší anxiety u L2 zvířat. V úlohách segregací baterie se pasivní chování prakticky neobjevovalo – pravděpodobně je to dáno tím, že zvířata se kromě vyhýbání zakázanému sektoru věnovala také sbírání pelet, což snad usnadnilo upevnění aktivních strategií anebo snížilo míru stresu.

Rozdíl v míře úzkostných projevů je překvapivý, protože snížená exprese Nogo-A v doposud publikovaných studiích anxieta neovlivňovala (Tews a kol., 2013, Willi a kol., 2009).

Navigace a paměť ve vodním bludišti nejsou expresí Nogo-A ovlivněny

V testech ve vodním bludišti se skrytým ostrůvkem byly obě skupiny schopny ostrůvek nalézt, dokázaly tedy používat vzdálené orientační body k lokalizaci skrytého cíle. Schopnost osvojit si pozici ostrůvku během jediné plavby a uchovat ji po různé dlouhou dobu rovněž nebyla sníženou expresí Nogo-A ovlivněna (obr. 7). Na základě výsledků popsanych v literatuře (Willi a kol., 2010, Tews a kol., 2013) jsme očekávali u L2 zvířat zvýšenou perseveraci, tj. tendenci hledat ostrůvek na místě, kde se nacházel během předešlého dne. Perseverativní chování se ale mezi skupinami nelišilo.

Knockdown Nogo-A neovlivní senzomotorické schopnosti potkanů

Test chůze po laťce neukázal žádné problémy s motorickou koordinací, což je v souladu s poznatky zjištěnými z literatury (Willi a kol., 2009). V testu Morrisova vodního bludiště s viditelným ostrůvkem se ukázalo, že potkani obou skupin nejsou schopni navigovat na poměrně malý viditelný cíl. Jejich zraková ostrost zřejmě nebyla dostatečně vysoká, což ovšem není u albinotických kmenů neobvyklé (Prusky a kol., 2002). V úlohách závislých na vzdálených orientačních bodech však tento problém nezabránil použití prostorové navigační strategie, patrně proto, že zvířata měla k dispozici dostatečně velké a kontrastní orientační body.

L2 potkani jako model schizofrenie

Specifické behaviorální projevy snížené exprese Nogo-A bývají interpretovány jako možné projevy schizofrenii podobného chování (Willi a kol., 2010, Tews a kol., 2013). Výsledky prezentované v této práci ukazují, že na tomto animálním modelu skutečně lze vysledovat projevy obdobné některým symptomům u schizofrenních pacientů.

Velmi závažným zjištěním je narušení senzomotorického gatingu (potlačena prepulsní inhibice úlekové reakce) a latentní inhibice (Willi a kol., 2010, Tews a kol., 2013), které poukazují na neurovývojové poškození, nemusí však být specifické jen pro schizofrenii.

Obdobou pozitivních (psychotických) symptomů schizofrenie jsou u zvířat především hyperlokomoce a stereotypie (Bubenikova-Valesova a kol., 2008). Změny v lokomoci ovšem jsou u Nogo-A deficientních

animálních modelů zaznamenávány jen v některých případech a nebývají nijak dramatické (s výjimkou hyperlokomoce navozené amfetaminem popsané Willi a kol., 2009), stereotypie nebyly zaznamenány vůbec.

Tews a kol. (2013) popsali u potkanů linie L2 projevy sociálního stažení, zdá se tedy, že přítomny jsou i některé negativní symptomy. V této práci jsme ovšem nezaznamenali projevy anhedonie jako dalšího negativního symptomu.

Zhoršená kognitivní koordinace a flexibilita, pozorovaná v této práci, patří k typickým kognitivním projevům schizofrenie (Phillips a Silverstein, 2003) a objevuje se také u jejích animálních modelů (Lee a kol., 2012). Pro schizofreniky je typický také deficit pracovní paměti. Naše výsledky v úloze *delayed-matching-to-place* ve vodním bludišti sice žádné problémy s pracovní pamětí neodhalily, nicméně Tews a kol. (2013) našli deficit krátkodobé paměti při rozpoznávání nových či přemístěných objektů. Tento nesoulad lze nejspíše vysvětlit velmi odlišným charakterem úloh (averzivní motivace vs. spontánní explorační, deklarativní vs. rekogniční paměť).

8. Závěr

Potkani se sníženou expresí Nogo-A vykazují selektivní kognitivní deficit separace prostorových rámců v úlohách kolotočového bludiště, který nelze vysvětlit celkovým zhoršením prostorové navigace, paměti ani motorických schopností. Výsledky nasvědčují také snížené kognitivní flexibilitě. Obě tato pozorování jsou v souladu s hypotézou očekávající u těchto zvířat příznaky podobné kognitivním symptomům schizofrenie.

Oproti zjištěním jiných autorů byla u zvířat se sníženou expresí Nogo-A zaznamenána snížená míra anxiety. Nepodařilo se prokázat deficit pracovní paměti, ani sníženou citlivost k příjemným podnětům.

Přihlédneme-li k biochemickým stanovením klíčových proteinů a jejich laterality (Kristofikova a kol., 2013), jsou naše výsledky konzistentní s hypotézou spojující sníženou expresi Nogo-A se schizofrenií podobným chováním u laboratorního potkana. Linie L2 sice vykazuje jen některé symptomy, nicméně to není na závadu, protože chybění některých skupin symptomů je u modelů schizofrenie obvyklé a je ve skutečnosti typické i pro lidskou schizofrenií, jejíž projevy jsou velmi individuální.

Na základě těchto pozorování se potkani se sníženou expresí Nogo-A jeví jako perspektivní animální model schizofrenie, a to zejména jejich kognitivních a některých negativních symptomů. Potenciální výhodou tohoto modelu je fakt, že zásah do exprese Nogo-A může odpovídat etiopatogenezi skutečné schizofrenie, nebo alespoň některých jejích případů. Také přítomnost především kognitivních a negativních symptomů je výhodná, protože právě tyto aspekty onemocnění se na tradičních (např. farmakologických) animálních modelech napodobují obtížně. Právě negativní a kognitivní příznaky jsou se současnými psychofarmaky obtížně léčitelné, a přitom často představují největší problém pro kvalitu života pacientů. Model schizofrenie založený na potlačení exprese Nogo-A by tak mohl být velmi užitečný pro testování nových, účinnějších antipsychotik.

9. Použitá literatura

- Bregman, B. S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H. N., Gao, D., Schwab, M. E., 1995. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*. 378(6556):498-501.
- Brösamle, C., Huber, A. B., Fiedler, M., Skerra, A., Schwab, M. E., 2000. Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J Neurosci*. 20(21):8061-8.
- Bubenikova-Valesova, V., Horacek, J., Vrajova, M., Höschl, C., 2008. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 32(5):1014-23. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.012.
- Carr, Z. J., Torjman, M. C., Manu, K., Dy, G., Goldberg, M. E., 2011. Spatial memory using active allothetic place avoidance in adult rats after isoflurane anesthesia: a potential model for postoperative cognitive dysfunction. *J Neurosurg. Anesthesiol*. 23, 138–145.
- Delekate, A., Zagrebelsky, M., Kramer, S., Schwab, M. E., Korte, M., 2011. NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2569-2574.
- Fouad, K., Klusman, I., Schwab, M. E., 2004. Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1. *European Journal of Neuroscience*, 20(9), 2479-2482.
- Fournier, A. E., Gould, G. C., Liu, B. P., Strittmatter, S. M., 2002. Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci*. 22(20):8876-83.
- GrandPré, T., Nakamura, F., Vartanian, T., Strittmatter, S. M., 2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403(6768), 439-444.
- Hawryluk, G. W., Rowland, J., Kwon, B. K., Fehlings, M. G., 2008. Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury. *Neurosurg Focus*. 25(5):E14. doi: 10.3171/FOC.2008.25.11.E14.
- Křištofiková, Z., Vrajová, M., Sírová, J., Valeš, K., Petrásek, T., Schönicg, K., Tews, B., Schwab, M., Bartsch, D., Stuchlík, A., Řípová, D., 2013. N-methyl-D-aspartate receptor–nitric oxide synthase pathway in the cortex of Nogo-A-deficient rats in relation to brain laterality and schizophrenia. *Front Behav Neurosci*, 7.
- Kubík, Š., Fenton, A. A., 2005. Behavioral evidence that segregation and representation are dissociable hippocampal functions. *The Journal of neuroscience*, 25(40), 9205-9212.

- Lee, H., Dvorak, D., Kao, H. Y., Duffy, Á. M., Scharfman, H. E., Fenton, A. A., 2012. Early cognitive experience prevents adult deficits in a neurodevelopmental schizophrenia model. *Neuron*, 75(4), 714-724.
- Mathis, C., Schröter, A., Thallmair, M., Schwab, M. E., 2010. Nogo-a regulates neural precursor migration in the embryonic mouse cortex. *Cerebral Cortex*, 20 (10): 2380-2390.
- Mingorance-Le Meur, A., Zheng, B., Soriano, E., and del Río, J. A., 2007. Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cerebral Cortex* 17(10), 2375-86.
- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- O'Carroll, C. M., Martin, S. J., Sandin, J., Frenguelli, B., Morris, R.G., 2006. Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learn Mem*, 13, 760-9.
- Pernet, V., Joly, S., Christ, F., Dimou, L., Schwab, M. E., 2008. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein differently regulate oligodendrocyte maturation and myelin formation. *J Neurosci*. 28(29):7435-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0727-08.2008.
- Phillips, W. A., Silverstein, S. M., 2003. Convergence of biological and psychological perspectives on cognitive coordination in schizophrenia. *Behavioral and Brain Sciences*, 26, 65-82.
- Schmandke, A., Schmandke, A., Schwab, M. E., 2014. Nogo-A Multiple Roles in CNS Development, Maintenance, and Disease. *The Neuroscientist*, 20(4):372-386.
- Schwab, M. E., 2004. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 14(1):118-24.
- Schwab, M. E., Schnell, L., 1991. Channeling of developing rat corticospinal tract axons by myelin-associated neurite growth inhibitors. *The Journal of neuroscience*, 11(3), 709-721.
- Steele, R. J., Morris, R. G., 1999. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*, 9, 118-36.
- Tews, B., Schönig, K., Arzt, M. E., Clementi, S., Rioult-Pedotti, M. S., Zemmar, A., Berger, S. M., Schneider, M., Enkel, T., Weinmann, O., Kasper, H., Schwab, M. E., Bartsch, D., 2013. Synthetic microRNA-mediated downregulation of Nogo-A in transgenic rats reveals its role as regulator of synaptic plasticity and cognitive function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(16):6583-8. doi: 10.1073/pnas.1217665110.

Wesierska, M., Dockery, C., Fenton, A. A., 2005. Beyond Memory, Navigation, and Inhibition: Behavioral Evidence for Hippocampus-Dependent Cognitive Coordination in the Rat. *J Neurosci*, 25, 2413–2419.

Willi, R., Weinmann, O., Winter, C., Klein, J., Sohr, R., Schnell, L., Yee, B. K., Feldon, J., Schwab, M.E., 2010. Constitutive genetic deletion of the growth regulator Nogo-A induces schizophrenia-related endophenotypes. *J Neurosci*. 30(2), 556-67. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4393-09.2010.

Willi, R., Schwab, M. E., 2013. Nogo and Nogo receptor: Relevance to schizophrenia? *Neurobiol. Dis.* 54:150-7. doi: 10.1016/j.nbd.2013.01.011.

Zagrebelsky, M., Schweigreiter, R., Bandtlow, C. E., Schwab, M. E., Korte, M., 2010. Nogo-A stabilizes the architecture of hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 30(40), 13220-13234.

Zörner, B., Schwab, M. E., 2010. Anti-Nogo on the go: from animal models to a clinical trial. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1198(s1), E22-E34.

10. Seznam publikací autora

Publikace přiložené k dizertační práci:

Křištofiková, Z., Vrajová, M., Sírová, J., Valeš, K., **Petrásek, T.**, Schönig, K., Tews, B., Schwab, M., Bartsch, D., Stuchlík, A., Řípková, D., 2013. N-methyl-D-aspartate receptor–nitric oxide synthase pathway in the cortex of Nogo-A-deficient rats in relation to brain laterality and schizophrenia. *Front Behav Neurosci*, 7. **IF = 4,8**

Petrásek, T., Prokopova, I., Bahnik, S., Schonig, K., Berger, S., Vales, K., Tews, B., Schwab, M.E., Bartsch, D., Stuchlik, A., 2014a. Nogo-A downregulation impairs place avoidance in the Carousel maze but not spatial memory in the Morris water maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 107:42-9. doi: 10.1016/j.nlm.2013.10.015. **IF = 4,035**

Petrásek, T., Prokopova, I., Sladek, M., Weissova, K., Vojtechova, I., Bahnik, S., Zemanova, A., Schonig, K., Berger, S., Tews, B., Bartsch, D., Schwab, M. E., Sumova, A., Stuchlik, A., 2014b. Nogo-A-deficient transgenic rats show deficits in higher cognitive functions, decreased anxiety and altered circadian activity patterns. *Front Behav Neurosci*, 8. **IF = 4,8**

Další impaktované publikace autora:

Stuchlík, A., **Petrásek, T.**, Vales, K., 2008. Dopamine D2 receptors and alpha1-adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task. *Behav Brain Res*, 189:139–144. **IF = 3,391**

Stuchlík, A., **Petrásek, T.**, Vales, K., 2009. A dose-response study of effects of pre-test administration of beta-adrenergic antagonist propranolol on the learning of active place avoidance, a spatial cognition task, in rats. *Behav Brain Res*, 200:144-149. **IF = 3,391**

Petrásek, T., Stuchlík, A., 2009. Serotonin-depleted rats are capable of learning in active place avoidance, a spatial task requiring cognitive coordination. *Physiol Res*. 58(2):299-303. **IF = 1,531**

Stuchlík, A., **Petrásek, T.**, Vales, K., 2009. Effect of alpha1-adrenergic antagonist prazosin on behavioral alterations induced by MK-801 in a spatial memory task in Long Evans rats. *Physiol Res*. 58(5):733-40. **IF = 1,531**

Petrásek, T., Doulames, V., Prokopova, I., Vales, K., Stuchlík, A., 2010. Combined administration of alpha1-adrenoceptor antagonist prazosin and beta-blocker propranolol impairs spatial avoidance learning on a dry arena. *Behav Brain Res*, 208(2):402-7. **IF = 3,391**

Prokopova, I., Bahnik, S., Doulames, V., Vales, K., **Petrásek, T.**, Svoboda, J., Stuchlík, A., 2012. Synergistic effects of dopamine D2-like receptor antagonist sulpiride and beta-blocker propranolol on learning in the Carousel maze, a dry-land spatial navigation task. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(1):151-156. **IF = 2,61**

Stuchlík, A., **Petrásek, T.**, Hatalová, H., Rambousek, L., Nekovarova, T., Vales, K., 2012. Behavioral tests for evaluation of information processing and cognitive deficits in rodent animal models of neuropsychiatric disorders. *Schizophrenia in the 21st Century*, 153-180.

Lobellova, V., Entlerova, M., Svojanovska, B., Hatalova, H., Prokopova, I., **Petrásek, T.**, Vales, K., Kubik, S., Fajnerova, I., Stuchlík, A., 2013. Two learning tasks provide evidence for disrupted behavioural flexibility in an animal model of schizophrenia-like behaviour induced by acute MK-801: A dose–response study. *Behav Brain Res*, 246:55–62. **IF = 3,391**

Stuchlík, A., **Petrásek, T.**, Prokopová, I., Holubová, K., Hatalová, H., Valeš, K., Kubík, S., Dockery, C., Wesierska, M., 2013. Place avoidance tasks as tools in the behavioral neuroscience of learning and memory. *Physiol Res*. 62 Suppl 1:S1-S19. **IF = 1,531**