

**Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Neurovědy



**Mgr. Tomáš Petrásek**

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

Learning and memory in Nogo-A knockdown rats

Disertační práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Aleš Stuchlík, PhD.

Praha, 2014

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům, za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze dne .....

.....  
Mgr. Tomáš Petrásek

## **Identifikační záznam:**

PETRÁSEK, Tomáš. *Učení a paměť u transgenních potkanů se sníženou expresí proteinu Nogo-A*. [Learning and memory in Nogo-A knockdown rats]. Praha, 2014. Počet stran, počet příloh. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Vedoucí závěrečné práce doc. RNDr. Aleš Stuchlík, PhD.

## **Poděkování**

V první řadě bych rád na tomto místě poděkoval svému školiteli a vedoucímu laboratoře, doc. RNDr. Aleši Stuchlíkovi, PhD., a to za vedení a odbornou i praktickou podporu nejen při vypracování této práce, ale také v průběhu celého mého studia. A také za jeho trpělivost, ochotu, přátelství, zkrátka všechno, co z něj dělá nejen výborného vědce a školitele, ale i jednoho z nejlepších lidí, které jsem měl možnost poznat.

Dále bych chtěl poděkovat svým kolegům a spolupracovníkům – Ivě Prokopové, která se mnou trávila dlouhé hodiny u experimentů, Štěpánu Bahníkovi, bez jehož statistických analýz a nově vyvinutého softwaru by tato práce nebyla zdaleka tak dobrá, zato však nesrovnatelně obtížnější, a dalším, ať již přispěli rukama, myšlenkou či obojím. Nemohu nezapomenout také technické pracovníky, Michaelu Fialovou, která se starala o experimentální zvířata od počátku až do konce, a pana Zahálku, bez něhož by to prostě nefungovalo. Dík zkrátka patří celému kolektivu oddělení Neurofyziologie paměti. Lidé sice během let přicházeli a odcházeli, nicméně zůstávalo to hlavní – přátelská atmosféra otevřená novým nápadům a vědecká práce na vysoké úrovni.

Zapomenout nemohu samozřejmě ani na další spolupracovníky v tuzemsku a zahraničí, kteří se na projektu přímo či nepřímo podíleli, zejména týmy z Psychiatrického centra Praha a Oddělení Neurohumorálních regulací, a naše zahraniční partnery z pracovišť v Německu a Švýcarsku.

Konečně musím poděkovat své rodině a své přítelkyni Ivetě Vojtěchové. Zaslouží si to – nejen za trpělivost, pochopení a podporu, ale především za to, že jsou.

A poděkování patří také potkanům, na něž bychom nikdy neměli zapomínat.

## **Grantová podpora**

Práce byla podpořena grantem GAUK 365911 uděleným Tomáši Petráskovi, dále granty GAČR 303/10J032, GAČR 14-03627S, P304/12/G069, IGA MZ CR NT13386, MŠMT LH14053 a AVČR M200111204 udělenými Aleši Stuchlíkovi.

## **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 zaslouhuje další výzkum.

## **Klíčová slova**

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

## **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

## Obsah

Prohlášení:.....	2
Identifikační záznam: .....	2
Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Obsah.....	6
Seznam zkratk .....	9
1. Předmluva.....	12
2. Teoretický úvod do problematiky .....	15
2.1. Protein Nogo .....	15
2.1.1. Objev a význam proteinů Nogo .....	15
2.1.2. Izoformy proteinu Nogo, jejich struktura a funkční význam jednotlivých domén .....	16
2.1.3. Zapojení proteinů Nogo do buněčné signalizace .....	22
2.1.4. Výskyt a lokalizace izoform proteinů Nogo.....	26
2.1.5. Fylogeneze proteinů retikulonové rodiny .....	28
2.2. Funkce proteinu Nogo-A.....	30
2.2.1. Nogo-A jako inhibitor axonálního růstu a regenerace .....	30
2.2.1.1. Delece genu <i>nogo</i> a axonální regenerace .....	32
2.2.1.2. Inaktivace NgR1, PirB a S1PR2 a axonální regenerace.....	36
2.2.2. Nogo-A ve vývoji CNS .....	38
2.2.3. Nogo-A jako regulátor synaptické plasticity.....	40
2.2.4. Další funkce Nogo proteinů a retikulonů obecně.....	43
2.2.4.1. Apoptóza .....	43
2.2.4.2. Neuroprotektivní působení.....	44
2.2.4.3. Ostatní funkce nogo proteinů a dalších retikulonů.....	45
2.3. Nogo proteiny a další retikulony v patologických procesech .....	46
2.3.1. Retikulony v patologii Alzheimerovy choroby .....	46
2.3.2. Role Nogo-A v kognitivních poruchách spojených se stárnutím.....	48
2.3.3. Nogo v amyotrofické laterální skleróze .....	49
2.3.4. Nogo a jeho vazební partneři v dalších poruchách CNS.....	50
2.3.5. Nogo proteiny a jejich vazební partneři v mrtvici a jejích modelech .....	51
2.3.6. Nogo a NgR1 ve schizofrenii .....	52

2.4. Chování a kognitivní funkce v animálních modelech s narušením Nogo-A dependentní signalizace .....	55
2.4.1. Úvod k animálním modelům schizofrenie .....	55
2.4.2. Transgenní modely zaměřené na Nogo-A .....	57
2.4.3. Transgenní modely zaměřené na receptory NgR1 a PirB .....	58
2.4.4. Transgenní potkani se sníženou expresí Nogo-A .....	61
3. Experimentální část .....	66
3.1. Cíle a hypotézy .....	66
3.2. Metody .....	67
3.2.1. Transgenní model .....	67
3.2.2. Zvířata .....	68
3.2.3. Kolotočové bludiště .....	69
3.2.3.1. Segregační baterie v kolotočovém bludišti .....	72
3.2.3.2. Úloha aktivního vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti .....	74
3.2.4. Morrisovo vodní bludiště .....	75
3.2.4.1. Úloha s viditelným ostrůvkem .....	75
3.2.4.2. Úloha <i>delayed-matching-to-place</i> .....	76
3.2.5. Chůze po laťce .....	76
3.2.6. Test pasivního vyhýbání ( <i>step-through avoidance</i> ) .....	77
3.2.7. Neofobie/Anhedonie .....	77
3.2.8. Statistické zpracování dat a sledované parametry .....	78
3.2.8.1. Kolotočové bludiště .....	78
3.2.8.2. Morrisovo vodní bludiště .....	79
3.2.8.3. Chůze po laťce .....	80
3.2.8.4. Test pasivního vyhýbání ( <i>Step-through avoidance</i> ) .....	80
3.2.8.5. Neofobie/Anhedonie .....	80
3.3. Výsledky .....	81
3.3.1. Kolotočové bludiště .....	81
3.3.1.1. Segregační baterie .....	81
3.3.1.2. Úloha aktivního vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti .....	84
3.3.2. Morrisovo vodní bludiště .....	88
3.3.2.1. Úloha s viditelným ostrůvkem .....	88
3.3.2.2. Úloha <i>delayed-matching-to-place</i> (DMP) .....	88
3.3.3. Chůze po laťce .....	89

3.3.4. Test pasivního vyhýbání ( <i>Step-through avoidance</i> ).....	89
3.3.5. Neofobie/Anhedonie .....	91
3.4. Diskuse .....	92
3.4.1. Ověření validity použitého modelu .....	92
3.4.2. Snížená exprese Nogo-A vede ke zhoršené výkonnosti v úlohách kolotočového bludiště .....	92
3.4.3. Anxieta v úloze aktivního vyhýbání se místu .....	94
3.4.4. Navigace a paměť ve vodním bludišti nejsou expresí Nogo-A ovlivněny.....	95
3.4.5. Knockdown Nogo-A neovlivní senzomotorické schopnosti potkanů .....	95
3.4.6. Neprostorová paměť v úloze pasivního vyhýbání i habituace na novou chuť jsou zachovány .....	96
3.4.7. Změny v cirkadiánním rytmu .....	96
3.4.8. Neurochemické změny a abnormální stárnutí u L2 zvířat .....	97
3.4.9. Celková interpretace.....	99
3.4.10. Nogo-A knockdown jako model schizofrenie.....	100
3.5. Závěr.....	103
4. Shrnutí .....	104
5. Seznam použité literatury .....	105
Publikace přiložené k dizertační práci: .....	128
Další publikace autora: .....	128



## Seznam zkratek

- AAPA – aktivní alotetické vyhýbání se místu (*active allothetic place avoidance*), úloha v kolotočovém bludišti
- AD – Alzheimerova demence
- ALS – amyotrofická laterální skleróza
- Amino-Nogo – sekvence aminokyselin na N-konci proteinu Nogo-A, nebo příslušný peptidový fragment
- APP – prekursorový protein  $\beta$ -amyloidu (*amyloid precursor protein*)
- ASY – alternativní označení genu *nogo*
- A $\beta$  –  $\beta$ -amyloid (peptid)
- BACE1 –  $\beta$ -sekretáza (*beta-amyloid converting enzyme 1*)
- BAFF – jiné označení pro protein BLyS (*B-cell activating factor*)
- Bcl-2 – regulační protein s antiapoptotickou aktivitou (*B-cell lymphoma 2*)
- Bcl-XS – regulační protein s antiapoptotickou aktivitou (*B-cell lymphoma extra small*)
- BLyS – rozpustný signální protein (*B-lymphocyte stimulator*), také označovaný jako BAFF
- cAMP – cyklický adenosin monofosfát
- Caspr – protein (*contactin-associated protein*)
- CNS – centrální nervová soustava
- CSPG – proteoglykany chondroitin sulfátu (*chondroitin sulfate proteoglycans*)
- CST – kortikospinální trakt
- DMP – *delayed-matching-to-place* (úloha ve vodním bludišti)
- EAE – experimentální autoimunitní encefalomyelitida
- EGFP – zelený fluorescenční protein (*enhanced green fluorescent protein*)
- EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor
- eNOS – endotelová syntáza oxidu dusnatého
- FGF – růstový faktor fibroblastů (*fibroblast growth factor*)
- GABA – kyselina  $\gamma$ -aminomáselná ( *$\gamma$ -aminobutyric acid*)
- GEF – enzymy zprostředkující výměnu GDP za GTP v molekule GTPázy (*guanine nucleotide exchange factors*)
- GPCR – receptory spřažené s G-proteiny (*G-protein coupled receptors*)
- GPI – glykosylfosfatidylinozitol, glykolipid sloužící často jako kotva připojující protein k membráně (GPI-kotva)
- GTP – guanosin trifosfát
- HEK293 – buněčná linie (*Human Embryonic Kidney 293 cells*)
- IN-1 – monoklonální protilátka proti proteinu Nogo-A
- iNOS – indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
- ITI – interval mezi první a druhou plavbou v Morrisově vodním bludišti (*inter-trial interval*)
- L2 – linie 2 (označení linie Nogo-A deficientních transgenních potkanů použité v této práci)

LARG – *leukemia-associated Rho guanine exchange factor* (protein patřící mezi GEF)

LG11 – rozpustný signální protein (*leucine-rich glioma-inactivated protein 1*)

LILRB2 – lidský ortolog myšního receptoru PirB (*leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2*)

LIMK1 – kináza (*LIM domain kinase 1*)

LINGO1 – *leucine-rich repeat and Ig domain containing protein 1* – člen receptorového komplexu NgR1

LOTUS – *lateral olfactory tract usher substance (cartilage acidic protein-1B)*

LRP1 – *low density lipoprotein receptor-related protein 1*

LRR – *leucine-rich repeat* (motiv proteinové sekvence nebo protein tuto sekvenci obsahující)

LTD – dlouhodobá deprese (*long-term depression*, forma neuroplasticity)

LTP – dlouhodobá potenciace (*long-term potentiation*, forma neuroplasticity)

MAG – *myelin-associated glycoprotein* (zástupce MAI)

MAI – inhibitor axonálního růstu spojený s myelinem (*myelin-associated inhibitor*)

MCAO – okluze *arteria cerebri media*

MHCI – *major histocompatibility complex class I*

miRNA – *microRNA*

MK-801 – dizocilpin (antagonista NMDA receptorů a psychotomimetikum)

mRNA – *messenger RNA*

MWM – Morrisovo vodní bludiště (*Morris water maze*)

NEP1-40 – syntetický peptid blokující vazebné místo NgR1 pro Nogo-A

NG2 – proteoglykan chondroitin sulfátu (*neuron-gial antigen 2*)

NgBR – receptor pro Nogo-B

NgR – Nogo receptor (izoformy NgR1 – NgR3)

NI-250 – starší označení proteinu Nogo-A

NMDA – N-methyl D-aspartát, agonista NMDA receptorů pro glutamát

nNOS – neuronální syntáza oxidu dusnatého

Nogo – *neurite outgrowth inhibitor* (zástupce MAI)

NogoR – Nogo receptor, alternativní označení pro NgR1

Nogo-66 – aminokyselinová sekvence proteinu Nogo nebo příslušný peptidový fragment, ligand NgR1 a PirB receptorů

NR1 – podjednotka NMDA glutamátového receptoru

NR2A – podjednotka NMDA glutamátového receptoru

NR2B – podjednotka NMDA glutamátového receptoru

NVHL – neonatální léze ventrálního hipokampu (*neonatal ventral hippocampal lesion*)

OMgp – *oligodendrocyte myelin glycoprotein* (zástupce MAI)

p75 – protein, člen rodiny neurotrofinových receptorů, člen receptorového komplexu NgR1

pCREB – signální protein (*phosphorylated cAMP response element binding protein*)

PFC – prefrontální kůra (*prefrontal cortex*)  
PirB – receptor pro Nogo-A a další MAI u myši (*paired immunoglobulin-like receptor B*), ortolog lidského LILRB2  
PNS – periferní nervová soustava  
PPI – prepulsní inhibice úlekové reakce  
Rac1 – G-protein z rodiny Rho (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)  
RGM – signální protein (*repulsive guidance molecule*), inhibitor axonálního růstu  
RHD – retikulonová homologní doména  
Rho – rodina signálních G-proteinů nebo některý z jejích členů  
RNA – ribonukleová kyselina  
RNAi – RNA interference  
ROCK – kináza asociovaná s proteiny Rho (*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*)  
RTN – retikulon (člen retikulonové rodiny proteinů)  
RTN-XS – Nogo-B  
RTNL – geny příbuzné retikulonům, vyskytující se u bezobratlých (*reticulon-like genes*)  
S1PR2 – serpentinový receptor, jeden z receptorů pro Amino-Nogo (*sphingosine 1-phosphate receptor 2*)  
siRNA – *short interfering RNA* nebo *silencing RNA*  
SNP – *single-nucleotide polymorphism*  
SOD1 – superoxid dismutáza 1  
TAJ/TROY – protein z nadrodiny receptorů pro TNF, člen receptorového komplexu NgR1  
WWP1 – ubiquitinová ligáza kódovaná genem WWP1

# 1. PŘEDMLUVA

Tato disertační práce se věnuje výsledkům behaviorální charakterizace transgenních potkanů se sníženou expresí (knockdown) proteinu Nogo-A. Tento transgenní model byl vytvořen v laboratořích v Německu a Švýcarsku (týmy prof. Schwaba a prof. Bartsche), a na jeho podrobnějším zkoumání zejména s ohledem na kognitivní funkce se v rámci mezinárodní spolupráce podílela i Laboratoř Neurofyziologie paměti, kde v letech 2010 – 2013 proběhly experimenty popsané na stránkách této práce.

Genové manipulace na potkaním modelu jsou stále ještě poměrně obtížným úkonem, například ve srovnání s rutinní přípravou transgenních myší, na druhé straně je ale potkan jako větší živočich s pestřejším repertoárem chování mnohem vhodnějším neurovědním modelem než laboratorní myš. Není vůbec náhoda, že jako cíl jednoho z prvních zásahů do genové exprese u potkana byla vybrána právě molekula Nogo-A. V uplynulých dvou desetiletích se totiž ukázalo, že tento proteinový produkt významně zasahuje do fungování centrální nervové soustavy obratlovců, pomáhá regulovat její fungování od embryonálního vývoje přes dospělost až po stárnutí, a projevy změn v jeho expresi lze pozorovat na úrovni buněk, tkání i celého organismu. Hraje roli v celé řadě chorobných stavů – původně byl popsán coby inhibitor regenerace po traumatickém poškození, nyní je však známa či se důvodně předpokládá jeho významná úloha v patologii některých degenerativních onemocnění či duševních poruch neurovývojového původu.

Poznání funkce molekuly s takto dalekosáhlými vlivy je zajisté kriticky důležité pro pochopení funkce mozku a léčbu celé řady jeho poruch, zároveň však jde o záležitost velmi nesnadnou. Ačkoli molekula Nogo-A je zkoumána již mnoho let a výsledkem tohoto výzkumu je řada zajímavých poznatků, z nichž některé se snad již brzy promítnou i do klinické praxe, zůstává zde překvapivě široká paleta nezodpovězených otázek a potenciál k otevření celých nových směrů výzkumu.

Předkládaná práce se věnuje především jednomu z mnoha aspektů fungování proteinu Nogo-A v organismu – jeho významu pro kognitivní funkce a možné souvislosti s duševními poruchami.

K práci jsou přiloženy tři studie publikované v časopisech s impaktním faktorem. Tyto články vznikly s přičiněním celé řady autorů ve spolupráci tuzemských i zahraničních laboratoří, proto považují za vhodné na tomto místě zrekapitulovat příspěvek jednotlivých autorů.

Petrásek, T., Prokopova, I., Bahník, S., Schonig, K., Berger, S., Vales, K., Tews, B., Schwab, M. E., Bartsch, D., Stuchlík, A., 2014a. Nogo-A downregulation impairs place avoidance in the Carousel maze but not spatial memory in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem.* 107:42-9.

Petrásek, T., Prokopova, I., Sládek, M., Weissova, K., Vojtechova, I., Bahník, S., Zemanova, A., Schonig, K., Berger, S., Tews, B., Bartsch, D., Schwab, M. E., Sumova, A., Stuchlík, A., 2014b. Nogo-A-deficient transgenic rats show deficits in higher cognitive functions, decreased anxiety and altered circadian activity patterns. *Front Behav Neurosci.* 8:90.

Křištofiková, Z., Vraiová, M., Šírová, J., Valeš, K., Petrásek, T., Schönig, K., Tews, B., Schwab, M., Bartsch, D., Stuchlík, A., Řípovalá, 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.* 7:90.

TOMÁŠ PETRÁSEK – design behaviorálních experimentů (kolotočové bludiště, Morrisovo vodní bludiště aj.) a jejich provedení, příprava zvířat a mozkových vzorků pro biochemickou analýzu, vyhodnocení behaviorálních dat, hlavní podíl na sepsání obou publikací jejichž je prvoautorem.

IVA PROKOPOVÁ – práce na behaviorálních experimentech, zejm. v kolotočovém bludišti.

ŠTĚPÁN BAHNÍK – statistické zpracování dat, autorství programu CM Manager pro analýzu dat z kolotočového bludiště.

IVETA VOJTĚCHOVÁ – spolupráce na behaviorálních experimentech.

ANNA ZEMANOVÁ – spolupráce na behaviorálních experimentech (zejm. Morrisovo vodní bludiště, neofobie-anhedonie) a fotografie experimentů a pokusných subjektů.

ALEŠ STUHLÍK – vedoucí disertační práce, poskytl zejména odborné vedení při designu experimentů, sepsání obou zmíněných studií a jejich publikaci.

MARTIN SLÁDEK, KAMILA WEISSOVÁ, ALENA SUMOVÁ – spolupracovníci z oddělení Neurohumorálních regulací FgÚ AV, prováděli testování cirkadiánní rytmicity chování u experimentálního modelu a verifikovali sníženou expresi Nogo-A u zkoumaných zvířat molekulárními metodami.

KAI SCHÖNIG, STEFAN BERGER, BJÖRN TEWS, MARTIN E. SCHWAB, DUSAN BARTSCH – pracovníci z partnerských zahraničních pracovišť v Německu a Švýcarsku, kde byl vyvinut použitý transgenní model.

ZDENA KŘIŠTOFIKOVÁ, MONIKA VRAIOVÁ, JANA ŠÍROVÁ, DANIELA ŘÍPOVÁ – pracovnice z Psychiatrického centra Praha, provedly neurochemickou analýzu mozku transgenních potkanů zaměřenou na laterální změny v expresi podjednotek NMDA receptoru a v aktivitě syntáz oxidu dusnatého.

S tématem této disertace souvisí také práce, Lobellova a kol. (2013), která se věnuje jinému (farmakologicky navozenému) modelu schizofrenie.

Lobellova, V., Entlerova, M., Svojanovska, B., Hatalova, H., Prokopova, I., Petrasek, T., Vales, K., Kubik, S., Fajnerova, I., Stuchlik, 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.

## 2. TEORETICKÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 2.1. Protein Nogo

#### 2.1.1. Objev a význam proteinů Nogo

Již řadu desetiletí je známo, že centrální nervový systém lidí a ostatních savců – na rozdíl od některých jiných orgánů a orgánových soustav, včetně periferních nervů – vykazuje jen minimální schopnost regenerace. Obzvláště závažným problémem je neschopnost obnovy poškozených axonů mozku a míchy (Ramón y Cajal, 1928). Právě proto je poškození způsobené úrazy CNS nebo neurodegenerativními onemocněními zpravidla ireverzibilní.

Tento stav přitom není podmíněn vlastnostmi samotných nervových buněk, ani nedostatkem růstových faktorů, nýbrž je vyvolán inhibičními molekulami typickými pro mozek a míchu.

U poškozených neuronů v CNS dochází k pučení nových axonů, za normálních podmínek však nedojde k jejich elongaci (nonpermisivní prostředí). V prostředí štěpu pocházejícího z periferního nervu (permisivní prostředí) jsou ovšem i axony centrálních neuronů schopny normálního růstu (David a Aguayo, 1981, Richardson a kol., 1980).

Nonpermisivní charakter prostředí CNS je dán působením inhibičních proteinů, produkovaných především gliemi (oligodendrocyty), které regeneraci axonů aktivně brání a způsobují degradaci růstového kužele (Schwab a Thoenen, 1985). Pokud je jejich činnost potlačena, schopnost růstu nervových vláken a funkční obnovy poškozené tkáně se výrazně zvyšuje. To samozřejmě otevírá potenciální cestu k regenerativní léčbě poškození míchy, úrazů mozku nebo následků mozkové mrtvice.

Již v 80. letech bylo zjištěno, že nejvýznamnější skupina těchto inhibitorů je exprimována v myelinových pochvách oligodendrocytů (MAI, *myelin-associated inhibitors*). Inhibitory byly identifikovány jako integrální membránové proteiny (Caroni a Schwab, 1988a). Již v této fázi výzkumu byly připraveny monoklonální protilátky proti těmto molekulám, obzvláště významná byla protilátka IN-1, jejíž cíl dostal provizorní označení NI-250. Caroni a Schwab (1988b) jako první zaznamenali, že blokáce inhibitorů pomocí těchto protilátek zlepšuje růstový potenciál axonů v jinak nonpermisivním prostředí CNS, Schnell a Schwab (1990) pak totéž demonstrovali také *in vivo*. Teprve o deset let později byla cílová molekula protilátky IN-1 (NI-250) identifikována a popsána jako Nogo-A

(Chen a kol., 2000), člen retikulonové (RTN) rodiny proteinů (GrandPré a kol., 2000), a její homolog byl popsán i u člověka (Prijnha a kol., 2000).

Protein Nogo-A se stal prvním dobře charakterizovaným MAI. Postupně však byly objevovány i další podobné molekuly. Ke „klasickým“ MAI se vedle Nogo-A řadí MAG (*myelin-associated glycoprotein*), jenž je ovšem přítomen i v periferním myelinu, a OMgp (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*), charakteristický zejména pro okolí Ranvierových zářezů. Mezi MAI bývají některými autory řazeny i transmembránový semaforin 4D (Sema4D/CD100), ephrin B3, netrin-1, proteoglykany V2 a brevikan (Duffy a kol., 2012, Lee a Zheng, 2012, Löw a kol., 2008, Schwab, 2004, Yiu a He, 2006), dále sulfatid (lipidová molekula, Winzeler a kol., 2011) a protein RGM (*repulsive guidance molecule*, Hata a kol., 2006). Molekule Nogo-A však stále patří v této skupině výsadní postavení – je totiž zdaleka nejlépe prostudovaná a z funkčního hlediska zřejmě i nejdůležitější.

Některé inhibitory axonálního růstu jsou asociovány s gliovou jizvou, formující se v místě poranění CNS. Patří sem semaforin 4D nebo chondroitin sulfát proteoglykany (CSPGs) (Bradbury a kol., 2002, Moreau-Fauvarque a kol., 2003, Niederöst a kol., 1999). CSPGs (aggrekan, brevikan, neurokan, versikan, fosfakan a NG2) jsou složkami extracelulární hmoty a jsou produkovány reaktivními astrocyty (přehled viz Yiu a He, 2006).

Proteiny Nogo a jejich receptory jsou v současné době předmětem rozsáhlého výzkumu, zaměřeného na potlačení jejich normální funkce a obnovu regenerativních schopností CNS. Slibné výsledky přinesla například neutralizace Nogo-A prostřednictvím specifických protilátek, která vedla k urychlení regenerace a funkčního zotavení CNS u experimentálních zvířat (Brosamle a kol. 2000, Liebscher a kol. 2005, Merkler a kol. 2001, Schwab, 2004). Experimentální aplikace těchto protilátek prochází klinickým testováním i na lidských pacientech (ve spolupráci evropské a severoamerické klinické sítě, firmy Novartis a univerzity v Curychu).

### **2.1.2. Izoformy proteinu Nogo, jejich struktura a funkční význam jednotlivých domén**

Proteiny Nogo patří do retikulonové (RTN) rodiny proteinů, jejíž členové jsou charakterizováni přítomností karboxyterminální evolučně konzervované sekvence 150 – 201 aminokyselin, označované jako retikulonová homologní doména (RHD; RTN doména či Pfam PF02453). Doména je tvořena dvěma hydrofobními úseky oddělenými smyčkou 66 aminokyselin (Oertle a kol., 2003a), jejichž topologie i funkční význam jsou ovšem zatím známy jen málo. Problematika topologického uspořádání retikulonových proteinů je velmi komplexní. Hydrofobní sekvence RHD jsou delší než obvyklé transmembránové úseky

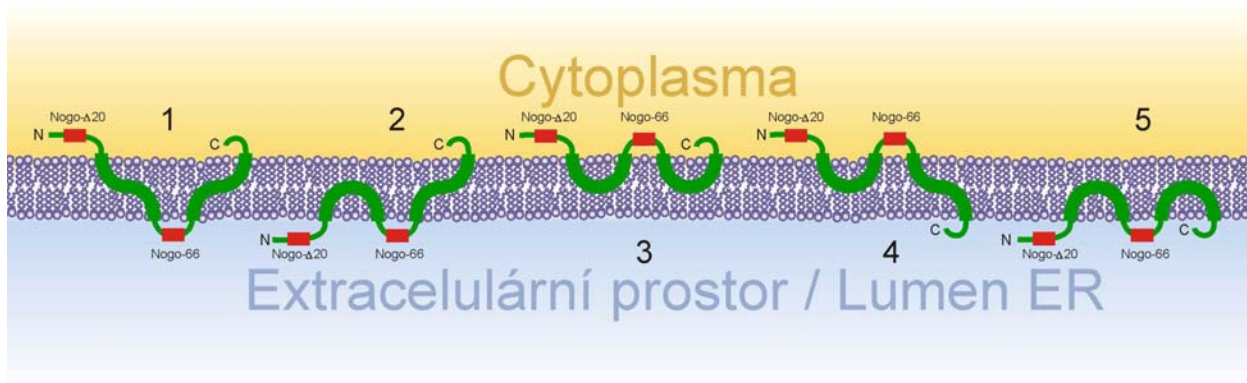


a jejich délka postačuje ke dvěma průnikům skrz membránu, mohou tedy v různých případech buď procházet membránou skrz, anebo zaujmout vlásenkovitou konformaci, kdy jsou do membrány zanořeny, ale oba jejich konce vystupují na stejné straně (Yang a Strittmatter, 2007). Možných membránových topologií díky tomu existuje celá řada (Teng a Tang, 2008, viz též obr. 1), a je známo, že i molekuly téhož proteinu mohou v závislosti na lokalizaci či jiných faktorech zaujímat různá uspořádání. Dodd a kol. (2005) dokonce uvažují, že RHD by mohla (zejména v endoplasmatickém retikulu) utvářet kanál nebo membránový transportér. V každém případě RHD ukotvuje protein v membráně a slouží jako signální sekvence, navádějící protein do membrán endoplasmatického retikula (Yang a Strittmatter, 2007).

N-konce retikulonů jsou v protikladu k RHD velmi variabilní, vykazují minimální homologii a plní zřejmě různé specifické funkce (Obr. 2).

Společným rysem genové rodiny retikulonů je také přítomnost většího množství exonů a intronů, dovolující vznik různých genových produktů – izoform proteinů – prostřednictvím alternativního sestřihu nebo použitím alternativních promotorů. U obratlovců obecně rozeznáváme geny RTN1 – RTN4, které jsou paralogy vzniklémi zmnožením ancestrálního genu. Ve všech případech kódují membránové proteiny, vyskytující se hojně v membránách endoplasmatického retikula. Podobné geny však najdeme i u bezobratlých, kde se označují jako *reticulon-like* (RTNL) geny (Yang a Strittmatter, 2007).

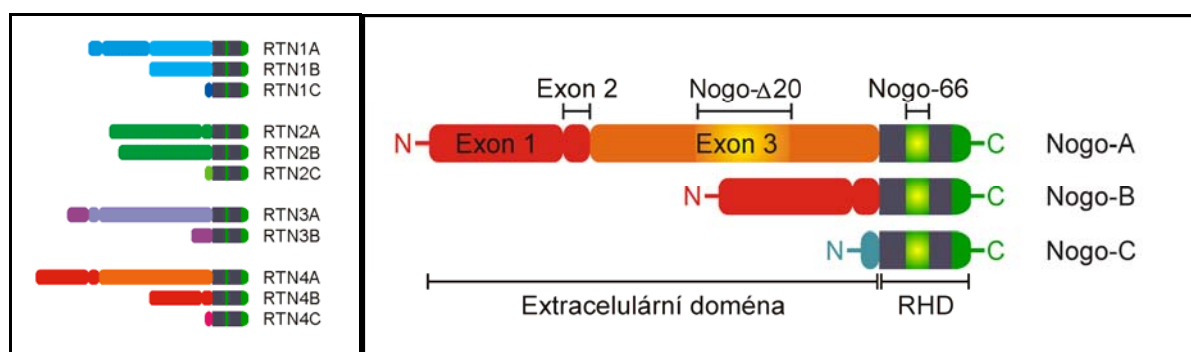
Ohledně funkčního významu této skupiny proteinů je toho známo překvapivě málo. RTN4 neboli Nogo je jediným jejich zástupcem, jehož funkce byla detailněji zkoumána, a ani v tomto případě se nedá tvrdit, že bychom rozuměli všem jejím aspektům (Oertle a kol., 2003a, b, Schwab, 2010). Faktem je, že přinejmenším izoformy RTN1-A, RTN1-C, RTN2-A a RTN4-A (Nogo-A) vykazují nejvyšší expresi v nervové tkáni (Oertle a kol., 2003b, podrobnější přehled viz také Yan a kol., 2006). DiScala a kol. (2005) popsali změny exprese izoform RTN3 ve vývoji mozečku a zrání granulárních buněk. Laurén a kol. (2007) zjistili u RTN2 a RTN3 vazbu na Nogo receptor, což zejména u RTN3, který se hojně vyskytuje v bílé hmotě míšni, může být funkčně významné. Je tedy možné, že Nogo-A není jediným proteinem této skupiny, který je funkčně asociovaný s CNS a podílí se na regulaci neuroplasticity.



**Obr. 1** Možné topologie Nogo proteinů na membránách

Zahrnutý jsou prokázané nebo předpokládané topologie *in vivo*. Vyznačeny jsou nejvýznamnější domény se signální funkcí (Nogo-66 a Nogo- $\Delta$ 20) a hydrofobní úseky (zanořené v membráně).

Podle Teng a Tang, 2008, Yang a Strittmatter, 2007, Schmandke a kol., 2014



**Obr. 2** Doménová struktura retikulonů

Vlevo: retikulonová rodina proteinů. RTN4A, B a C odpovídají proteinům Nogo.

Vpravo: Detailní schéma primární struktury proteinů Nogo, s vyznačením retikulonové homologní domény (RHD), jednotlivých exonů a signálních sekvencí. Hydrofobní úseky jsou vyznačeny tmavošedě.

Podle GrandPré a kol., 2000, Yang a Strittmatter, 2007

Yang a Strittmatter (2007) rozdělují zjištěné nebo předpokládané funkce retikulonů na tři volně definované oblasti. První z nich zahrnuje funkce asociované s endoplasmatickým retikulem, vesikulárním transportem a membránovou morfologií, což odpovídá lokalizaci těchto proteinů v endoplasmatickém retikulu. Spadá sem i poněkud kontroverzní úloha retikulonů v procesech apoptózy. Druhá úloha, kterou tyto proteiny plní, je typická právě pro protein Nogo, a jedná se o úlohu inhibiční signální molekuly typické především pro myelinové membrány oligodendrocytů. Konečně třetí oblastí, do níž retikulony významně promlouvají, jsou neurodegenerativní choroby. Je třeba říci, že tyto tři oblasti nemusejí představovat jasně vymezené kategorie, ale mohou být vzájemně provázány.

Gen *nogo* (RTN4 či též ASY) vytváří tři různé proteinové produkty – izoformy Nogo proteinu, označované Nogo-A (1163 aminokyselin, také označovaný jako RTN4-A nebo NI-250, databázové označení AJ242961), Nogo-B (360 aminokyselin, RTN4-B, RTN-XS, AJ242962) a Nogo-C (199 aminokyselin, RTN4-C, AJ242963) (Chen a kol., 2000; struktura viz obr. 2). Zatímco Nogo-A a Nogo-B jsou produkty alternativního sestřihu stejného transkriptu, Nogo-C vzniká použitím alternativního promotoru (Schwab, 2010).

Všechny sdílejí retikulonovou homologní doménu zahrnující 188 aminokyselin na C-konci, s hydrofobními úseky o délce 35 a 36 aminokyselin. Hydrofilní smyčka mezi nimi je v tomto případě označovaná jako Nogo-66. Nogo-A a Nogo-B sdílejí společnou N-koncovou doménu o délce 172 aminokyselin, kódovanou exony 1 a 2 genu *nogo*. V případě Nogo-A je navíc zahrnuta i prolinem bohatá sekvence 800 aminokyselin kódovaná exonem 3, oddělující N-koncovou doménu od sdílené domény na C-konci. Celý N-koncový extracelulární řetězec izoformy Nogo-A, zahrnující aminokyseliny 1-979, bývá označován jako „amino-Nogo“ (Schwab, 2010). Nogo-C je nejkratší a nejjednodušší izoformou, ke sdílené RTN doméně zde nasedá na N-konci jen několik málo aminokyselin.

Vedle těchto tří dominantních izoform existuje přinejmenším sedm méně významných splicingových variant (Oertle a kol., 2003b).

To, co bylo řečeno o možnostech různých konformací u retikulonů obecně se týká i proteinů Nogo. Pokud jsou jejich izoformy Nogo-A a B lokalizovány na povrchu buňky, jejich C-konec je obrácen do cytoplasmy, zatímco úsek Nogo-66 a N-konec jsou exponovány v mezibuněčném prostoru a přístupné pro interakce s receptory jiných buněk (Dodd a kol., 2005, Schwab, 2010; topologie č. 2 na obr. 1), Schmandke a kol. (2014) připouštějí i další topologii (č. 5 na obr. 1). Všechny tři izoformy Nogo, zvláště pokud jsou lokalizovány v membránách endo-plasmatického retikula, mohou zaujímat také konformaci s C- i N-konci řetězce otočenými do cytoplasmy (Oertle a kol., 2003c, Schwab, 2010, Voeltz a kol., 2006, Schmandke a kol., 2014); topologie č. 1, případně i č. 3 na obr. 1). Jaký mají tyto topologické změny funkční význam, není dosud známo, bylo navrženo, že v endoplasmatickém retikulu by mohly řídit míru zakřivení membrány. Myslitelná je i řada dalších možných konformací, které jsou však spíše minoritní nebo nebyly *in vivo* dosud prokázány.

Smyčka Nogo-66 (úsek převážně hydrofilních aminokyselin, zahrnující tři alfa-šroubovice a nestrukturované úseky mezi nimi; u potkana jde o aminokyseliny 1026 – 1091), která je součástí domény RHD, byla prvním úsekem Nogo proteinů, u nějž byla zjištěna signalizační funkce. Bylo prokázáno, že tento úsek slouží jako signál inhibující axonální růst a způsobující kolaps růstových kuželů (GrandPré a kol., 2000). Příjemcem signálu je Nogo receptor (NgR1, NogoR či též Nogo-66 receptor) a dále také nově objevený receptor PirB (Schwab, 2010). Význam tohoto úseku jako samostatného signálu ovšem není zcela jasný.

GrandPré a kol. (2000) ukázali, že izoforma Nogo-C, jejíž N-koncový řetězec je zanedbatelný (a tedy působí primárně přes Nogo-66), způsobuje kolaps růstových kuželů *in vitro* a Kim a kol. (2003a) ověřili, že dokáže tlumit axonální růst *in vivo*. Ovšem Oertle a kol. (2003c) nenalezli žádnou inhibiční aktivitu Nogo-C v experimentech na buněčných kulturách.

Smyčka Nogo-66 je dále ligandem i pro protein Caspr (*contactin-associated protein*), zprostředkující lokalizaci draslíkových kanálů na paranodálních úsecích axonu (Nie a kol., 2003).

Málo prozkoumanou otázkou je, zda inhibici axonálního růstu mohou zprostředkovávat také hydrofilní smyčky RHD domény jiných retikulonů, vykazující vysokou sekvenční homologii s Nogo-66. GrandPré a kol. (2000) nenašli u těchto fragmentů žádný efekt na růstové kužely neuronů, Yang a Strittmatter (2007) uvádějí, že ani RTN1, u kterého je příslušná sekvence nejpodobnější Nogo-66, není ligandem NgR1. Vazba na NgR1 však byla překvapivě popsána u poněkud odlišnějších RTN2 a RTN3 (Laurén a kol., 2007).

Doména Nogo-66 ovšem není jediným inhibičním signálem, a patrně není ani tím nejdůležitějším. Nogo-66 smyčka je totiž společná všem izoformám Nogo proteinu, a tudíž se vyskytuje u všech obratlovců a v mnoha typech buněk. Najdeme ji i v tkáních, které představují pro růst axonů permissivní prostředí. Pro nonpermissivní prostředí savčí CNS jsou tedy nejspíše důležitější úseky exonu 3 v N-terminální doméně Nogo-A (Oertle a kol., 2003a).

N-koncová část izoformy Nogo-A (amino-Nogo) je jejím nejdelším a zřejmě i funkčně nejvýznamnějším úsekem. Je z největší části nestrukturovaná, což může poukazovat na její funkční flexibilitu a schopnost zapojovat se do proteinových komplexů (Yang a Strittmatter, 2007). Poměrně brzy bylo zjištěno, že má podíl na inhibičních účincích izoformy Nogo-A a působí na morfologii cílových buněk (Fournier a kol., 2001, Oertle a kol., 2003a, c).

Mechanismy jejího působení však zatím nejsou zcela vysvětleny, a zdá se, že zahrnují jak vazbu na známé receptory NgR1 a PirB, tak i mechanismy na nich nezávislé.

Hu a kol. (2005) popsali sekvenci 24 aminokyselin na C-konci fragmentu amino-Nogo (aminokyseliny 995–1018) označovanou jako Nogo-A-24, která se váže na receptor NgR1 společně s Nogo-66, zvyšuje afinitu této vazby a podporuje aktivaci receptoru. Tatáž sekvence je také ligandem pro PirB (Huebner a kol., 2011).

Úsek Nogo- $\Delta$ 20, zahrnující aminokyseliny 544–725 (Niederost, 2002, Oertle a kol., 2003a, 2003c) zajišťuje na NgR1 nezávislou inhibici axonální regenerace. Joset a kol. (2010) ukázali, že tento peptid je endocytován neurony mechanismem nezávislým na NgR1, který je podle všeho klíčový pro jeho inhibiční působení, Kempf a kol. (2014) pak v navazující studii zjistili, že tato signalizace je závislá na receptoru S1PR2 (viz kapitola 2.1.3).

Oertle a kol., (2003c) hledali oblasti Nogo proteinů ovlivňující fibroblasty a neurony *in vitro*. Ukázali, že N-koncová doména společná Nogo A i Nogo-B inhibuje rozšiřování fibroblastů (*fibroblast spreading*) v buněčné kultuře, ale na neurony působí jen slabě. Nogo-66 nepůsobí na fibroblasty ani na elongační růst axonů, způsobuje ovšem kolaps neuronálních růstových kuželů. Nogo-A specifické úseky působí u neuronů primárně silnou inhibici axonálního růstu, ale kolaps růstových kuželů indukují méně účinně. Vedle Nogo- $\Delta$ 20 se ukázal jako významný též úsek, který označili NiR- $\Delta$ 2 (aminokyseliny 59–172), inhibující rozšiřování fibroblastů i axonální růst. Působení Nogo-A i fragmentu Nogo-66 se ukázalo jako nezávislé na NgR1.

Laurén a kol. (2007) popsali sekvenci 39 aminokyselin na C-konci molekuly označenou Nogo-C39 (navzdory matoucímu názvu byl tento fragment odvozen z izoformy Nogo-A), která se také váže na receptory NgR1 i PirB a je zřejmě funkčně relevantní (Huebner a kol., 2011).

Zajímavé je, že aminokyseliny v pozicích 30 – 53 (sekvence společná Nogo-A i Nogo-B) mohou představovat nízkoafinní vazebné místo pro vápník (Oertle a kol., 2003b). Zda tomu tak skutečně je a zda má tato oblast nějaký funkční význam zatím bohužel není známo.

### 2.1.3. Zapojení proteinů Nogo do buněčné signalizace

Nogo receptor (NgR1 či též Nogo-66 receptor) je prvním popsáným receptorem schopným vázat Nogo-A. Patří mezi proteiny s repetitivními úseky bohatými na leucin (LRR) a k buněčné membráně je přichycen GPI-kotvou. Vazebnou doménu se již podařilo krystalizovat, struktura receptoru je tedy poměrně dobře známá (He a kol., 2003).

Jak již bylo zmíněno, rozeznává především úsek Nogo-66 společný všem izoformám Nogo, afinita vazby je ovšem zvýšena N-terminální částí Nogo-A. Váže ale také jiné inhibitory axonálního růstu: MAG (*myelin-associated glycoprotein*) a OMgp (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*), ačkoli MAG je s vyšší afinitou rozeznáván příbuzným receptorem NgR2. Překvapivě váže také další potentní inhibitor axonálního růstu, CSPG (proteoglykany chondroitin sulfátu, Dickendesher a kol., 2012). Tato „promiskuita“ NgR1 je překvapující, protože jím rozpoznávané molekuly nevykazují žádnou sekvenční homologii. Receptor má tedy zřejmě více specifických vazebných míst pro různé ligandy (He a kol., 2003). Pozoruhodná je vazba NgR1 na fragmenty  $\beta$ -amyloidu, spojené s Alzheimerovou chorobou (Park a kol., 2006a, b). Dalšími identifikovanými vazebnými partnery NgR1 jsou FGF (*fibroblast growth factor*) 1 a 2 (Lee a kol., 2008), a rozpustné proteiny BLYS (*B-lymphocyte stimulator*) a LGI1 (*leucine-rich glioma-inactivated protein 1*), které rovněž regulují růst axonů (přehled viz Schwab, 2010). LGI1 je zajímavý tím, že je to přirozený kompetitivní antagonist NgR1, blokující působení MAI (Thomas a kol., 2010). Dalším antagonistou NgR1, který je velmi významný v regulaci vývoje čichového traktu, je nedávno popsáný protein LOTUS (Sato a kol., 2011).

Funkce NgR1 je dále regulována jeho fosforylací extracelulární kaseinkinázou 2, která inhibuje jeho vazbu na substrát a tlumí tak signalizaci (Takei, 2009).

Zajímavé je, že NgR1 může být v podmínkách *in vivo* štěpen zinkovou metalloproteázou. Rozpustný N-terminální fragment vzniklý tímto štěpením blokuje přirozený ligand Nogo-66, aniž by se zapojoval do signálních komplexů (Walmsley a kol., 2004).

Příbuzné proteiny NgR2 a NgR3, navzdory svému názvu i strukturní homologii, nevážou Nogo-A (Akbik a kol., 2012, Zheng a kol., 2005), NgR2 však může vázat inhibičně působící MAG (Lauren a kol., 2007, Venkatesh a kol., 2005) a NgR3 váže CSPG (Dickendesher a kol., 2012), což je rovněž spojuje s inhibicí axonálního růstu. NgR1 se specificky váže s NgR3, a toto spojení by mohlo mít funkční význam (Zhang a kol., 2011).

NgR1 postrádá transmembránovou doménu, sám o sobě proto nemůže přenášet signál do cytoplasmy. Svou roli tedy může plnit jen jako součást většího komplexu koreceptorů. Mezi popsané nebo alespoň důvodně předpokládané složky Nogo receptorového komplexu patří neurotrofinový receptor p75 (Wang a kol., 2002a) a jemu příbuzný protein TAJ/TROY (Park a kol., 2005). S NgR1 asociuje a na jeho funkci se podílí také LINGO1, patřící rovněž mezi LRR proteiny. Předpokládá se též role receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR).

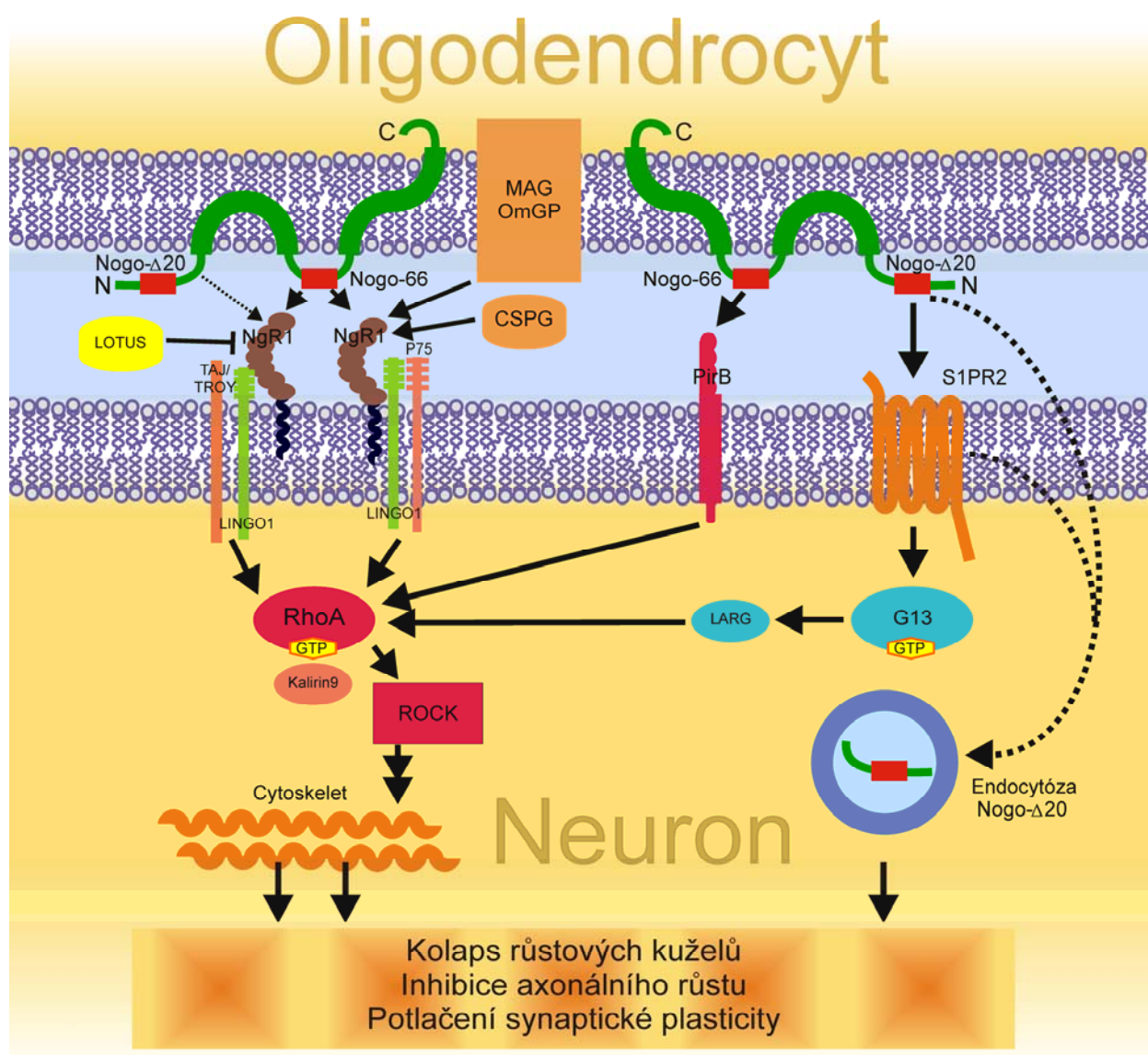
Na dalším přenosu signálu se podílí GEF Kalirin9 (Harrington a kol., 2008), který výměnou GDP za GTP aktivuje malou GTPázu Rho-A, jež potom aktivuje kinázu ROCK. Posledně jmenovaná pak působí na aktinomyosinová vlákna, čímž přímo vyvolá kolaps růstového kužele neuronu (přehled viz Schwab, 2010, Yang a Stritmatter, 2007). Dalšími efektorovými proteiny jsou kináza LIMK1 a G-protein Rac1 (Akbik a kol., 2012). Signalizace přes NgR1 zahrnuje také změny hladiny intracelulárního vápníku (Bandtlow a kol., 1993) a aktivity proteinkinázy B (Wang a kol., 2011a). Celkovým důsledkem signalizace přes Nogo-A-NgR1 je modulace dynamiky exoskeletu (zprostředkovaná proteiny Rho a Rac) a s tím související kolaps růstových kuželů nebo reorganizace dendritického větvení a trnů a další změny neuronální morfologie (Zagrebelsky a kol., 2010).

V roce 2008 popsalí Atwal a kol. druhý receptor rozeznávající doménu Nogo-66. Je jím protein označovaný u člověka LILRB2 (*leukocyte immunoglobulin-like receptor B2*), jehož myším ortologem je PirB (*paired immunoglobulin-like receptor B*). Signalizace přes PirB zahrnuje, podobně jako v případě NgR1, GTPázu Rho a kinázu ROCK (Wang a kol., 2012).

Stejně jako NgR1, i on rozeznává též další MAI, konkrétně MAG a OMgp, třebaže původně byl popsán jako receptor pro MHCI (*major histocompatibility complex I*). Představuje tak zajímavý a nečekaný průnik mezi receptory pro MAI a pro molekuly spojené spíše s imunitním systémem. Je ovšem pravdou, že také NgR1 byl již nalezen u buněk imunitního systému (přehled viz Borrie a kol., 2012).

Podle výsledků Atwal a kol. (2008) je aktivace PirB potentnějším inhibičním signálem pro axony než signalizace přes NgR1, v organismu ale oba receptory působí společně a jsou navzájem zastupitelné. Kombinovaná blokáda nebo genetická delece obou proto zvýší regenerační schopnost axonů více než odstranění jen jednoho z nich. V téže studii byly ovšem nalezeny i důkazy svědčící pro existenci dalších receptorů rozpoznávajících doménu Nogo-66, protože i po současném odstranění PirB a NgR1 jeví fragment Nogo-66 určitou zbytkovou inhibiční aktivitu vůči rostoucím axonům *in vitro*.

Význam PirB v podmínkách *in vivo* je ovšem poněkud kontroverzní a patrně je omezen jen na specifické oblasti. Huebner a kol. (2011) ukázali, že ačkoli se tento receptor váže na různé části molekuly Nogo-A s vysokou afinitou, jeho funkční význam je v případě studovaných kortikálních neuronů zcela zanedbatelný, patrně proto, že je v nich exprimován v minimálním množství. Akbik a kol. (2012) podávají přehled studií ukazujících, že v mnoha relevantních strukturách CNS je tento receptor velmi vzácný, a v kortikospinálním traktu se nenalézá vůbec. Zablokování signalizace *in vivo* sice vede ke zvýšení plasticity v kůře, na regeneraci po poranění míchy ovšem vliv nemá.



Obr. 3 Receptory pro Nogo-A, jejich vazebná místa a signální kaskády

Podle Schwab, 2010, fig1, Schwab a Strittmatter, 2014, Yang a Strittmatter 2007



Receptory pro amino-Nogo segment, specifickou část proteinu Nogo-A, zůstávají prozatím málo známé, třebaže funkční význam této oblasti byl opakovaně prokázán (viz kapitola 2.1.2.). K původním kandidátům patřily GPR50, „sirotčí“ receptor ze skupiny GPCR (Grunewald a kol., 2009), olfaktomedin, LRP1 a integriny (přehled viz Schwab a Strittmatter, 2014). Inhibiční funkce amino-Nogo je spojená s narušením integrinové signalizace a inhibicí buněčné adheze, přičemž je ovlivněna charakterem mezibuněčné hmoty (Hu a Strittmatter, 2008). Není dosud ale jasné, zda jde o přímou vazbu na integriny, nebo zda je zprostředkována komplexem dalších proteinů (Hu a Strittmatter, 2008).

Nově bylo zjištěno, že jeden ze signálních úseků amino-Nogo, peptid Nogo- $\Delta$ 20, je ligandem receptoru pro sfingosin-1-fosfát, patřícího mezi GPCR (Kempf a kol., 2014). Jedná se o receptor S1PR2 (*sphingosine 1-phosphate receptor 2*), který má pro Nogo- $\Delta$ 20 specifické vazebné místo, odlišné od vazebné kapsy pro sfingosin-1-fosfát. Signál je dále předáván na G-protein G<sub>13</sub>, protein LARG a GTPázu Rho-A, která je aktivována také receptory NgR1 a PirB, a představuje tak společný prvek, kde se sbíhá signalizace přes všechny známé receptory pro Nogo-A.

Vazba Nogo- $\Delta$ 20 na S1PR2 vede k jeho endocytóze. Již starší práce (Joset a kol., 2010) ukázaly, že Nogo- $\Delta$ 20 je endocytován axony mechanismem nezávislým na NgR1. Ve fyziologických podmínkách je patrně takto endocytován celý protein Nogo-A, nebo jeho proteázou odštěpený amino-Nogo řetězec. Endozómy obsahující Nogo- $\Delta$ 20 („signalozómy“) mohou být retrográdně transportovány do somatu, a představují signál, jímž Nogo- $\Delta$ 20 zprostředkuje kolaps růstového kužele neuronu. Signalizace zahrnuje aktivaci GTPázy Rho a zvýšení hladiny pCREB (Joset a kol., 2010). Důsledkem signalizace je destabilizace neuronálního cytoskeletu (Niederost a kol., 2002).

Odlišné úseky Nogo-A tedy působí odlišnými mechanismy (přehled viz Pernet a Schwab, 2012).

Taketomi a kol. (2002) poukázali na možnost asociace či vazby mezi Nogo-A a cytoskeletárním tubulinem v axonech, která by mohla funkčně souviset s dozráváním myelinu. Quin a kol. (2008) popsali interakci mezi Nogo-A a E3 ubiquitinovou ligázou WWP1. Tato interakce podle nich může regulovat míru ubiquitylaci Nogo-A a tím i jeho množství.

Pozoruhodná je i schopnost Nogo-A interagovat a vytvářet heterotypické komplexy s jinými Nogo izoformami – v tomto případě patrně nejde o obyčejnou agregaci, protože molekuly Nogo-A se na sebe vzájemně nevážou (Dodd a kol., 2005). Byla popsána také vazba na RTN3 v endoplasmatickém retikulu přes hydrofobní sekvence RHD, s možným významem v regulaci apoptózy (Qi a kol., 2003).

Někteří autoři nevylučují ani možnost, že proteiny Nogo by mohly samy fungovat jako receptory (Huber a kol., 2002). Do dnešního dne ale takový mechanismus popsán nebyl.

Specifický receptor byl již objeven pro izoformu Nogo-B. Je označován jako NgBR (Miao a kol., 2009, Schwab, 2010) a zprostředkuje remodelaci a morfogenezi cév. Jeho ligandem jsou aminokyseliny 1 – 200 extracelulárně exponované N-terminální části Nogo-B (Acevedo a kol., 2004). NgBR hraje roli v buněčném transportu cholesterolu (Harrison a kol., 2009)

#### **2.1.4. Výskyt a lokalizace izoform proteinů Nogo**

Výskyt Nogo-A je typický zejména pro bílou hmotu CNS, hlavně pro myelinové pochvy oligodendrocytů, kde je lokalizován především na vnitřních (adaxonálních) a vnějších (abaxonálních) membránách, vyskytuje se ovšem i v tělech a výběžcích (GrandPré a kol., 2000, Huber a kol., 2002, Chen a kol., 2000, Wang a kol., 2002b). Tento protein je však přítomen i v některých neuronech, zejména v CNS (GrandPré a kol., 2000, Huber a kol., 2002, Hunt a kol., 2003, Chen a kol., 2000, Josephson a kol., 2001). Jedná se o buňky čichového bulbu (Richard a kol., 2005), hipokampální pyramidové buňky a interneurony (Huber a kol., 2002, Meier a kol., 2003, Mingorance a kol., 2004, Wang a kol., 2002b), některé neurony kortexu, Purkyňovy buňky, spinální motoneurony a buňky zadních kořenů míšních (Dodd a kol., 2005, Hunt a kol., 2003). Vyskytuje se též na presynaptických elementech nervosvalových plotének (Dodd a kol., 2005). Přechodně se může objevit také v reaktivních astrocytech po mozkové lézi (Mingorance a kol., 2004). Mimo CNS se objevuje v srdci a varlatech (Huber a kol., 2002, Chen a kol., 2000) a vyvíjejících se, ne však dospělých svalectech (Josephson a kol., 2001, O'Neill a kol., 2004).

Nogo-B se sice vyskytuje v CNS, ovšem méně hojně než Nogo-A. Je detekovatelný v hipokampálních neuronech (Meier a kol., 2003). Je přítomen i v PNS a mnoha periferních tkáních, ne ovšem v kosterních svalectech (Huber a kol., 2002, Oertle a kol., 2003b). Důležitá je jeho role v cévách, kde se za normálních okolností nalézá v buňkách endotelu a hladkého svalu.

Nogo-C je v mozku relativně vzácný, v myelinu chybí (Huber a kol., 2002). V jisté míře je však zastoupen v některých neuronech CNS, např. Purkyňových buňkách mozečku (Dodd a kol., 2005). Je velmi typický pro kosterní svaly, kde v průběhu jejich dozrávání nahrazuje Nogo-A. Méně hojný je ve svalu srdečním, vyskytuje se ale i v dalších periferních tkáních (Huber a kol., 2002, Chen a kol., 2000).

Josephson a kol. (2001) ukázali, že ani jedna z izoform Nogo proteinu se nevyskytuje ve Schwannových buňkách periferních nervů, astrocytech ani ependymocytech.

Velmi důležitá je nejenom lokalizace proteinu na úrovni tkání a buněčných typů, ale také v rámci jednotlivých buněk.

Všechny izoformy proteinu Nogo se v buňkách, které je exprimují, nacházejí ve velkém množství intracelulárně, v endoplasmatickém retikulu a Golgiho komplexu (Dodd a kol., 2005, GrandPré a kol., 2000, Chen a kol., 2000, Oertle a kol., 2003c). Nogo proteiny jsou zde navíc dosti specifické pro periferní retikulární endoplasmatické retikulum, v jaderném obalu potom zcela chybějí (Voeltz a kol., 2006). Z hlediska mezibuněčné signalizace ale hraje roli především jejich výskyt na povrchu buněk. I tam je jejich umístění přísně regulováno. Je známo, že se vyskytují v ostrůvkovitých shlucích a jsou vázány na membránové mikrodomény (Acevedo a kol., 2004, Dodd a kol., 2005).

Důležitým aspektem funkce Nogo proteinů a jejich receptorů je jejich exprese v reakci na poranění a jiná poškození CNS. Starší práce v těchto případech většinou nezaznamenávaly žádné výrazné změny. Huber a kol. (2002) tak nenalezli zvýšenou expresi Nogo-A ani Nogo-B v místě poranění ani v gliové jizvě. Josephson a kol. (2001) popsali dokonce pokles Nogo-A v místě traumatické léze, bez zvýšené exprese v jejím okolí. Další studie ovšem zaznamenaly zvýšenou expresi Nogo proteinů v okolí léze míchy (Hunt a kol., 2003, Wang a kol., 2002b) nebo po poranění mozku (Meier a kol., 2003), a to jak v neuronech, tak i gliích (Mingorance a kol., 2004). Zvýšení exprese Nogo-A se také objevuje v reakci na ischemii (Cheatwood a kol., 2008, Jiang a kol., 2009, Wang a kol., 2007, Wang a kol., 2010a). Toto zvýšení exprese by podle některých autorů mohlo mít neuroprotektivní vliv.

Exprese Nogo-A je regulována také vazbou na NgR1 – nemožnost vazby na receptor vede k poklesu exprese Nogo-A (Peng a kol., 2011).

Receptor NgR1 je v mozku přítomen výhradně v neuronech, a to prakticky ve všech oblastech (Fournier a kol., 2001, Wang a kol., 2002b). Totéž platí i o ostatních izoformách NgR, přičemž NgR1 a 2 jsou charakteristické pro axony a jejich růstové kužely. NgR ale najdeme i v buňkách imunitního systému (Borrie a kol., 2012).

V rámci buňky nalezneme NgR1 na axonálních a postsynaptických membránách, což dobře odpovídá jeho funkci v regulaci axonálního růstu a plasticity. V membránách je soustředěn v membránových raftech a může dokonce oligomerizovat (Fournier a kol., 2002). U myši se objevuje teprve postnatálně, ve věku 15 dnů (přehled viz Akbik a kol., 2012).

Další z receptorů pro Nogo-A, PirB, je v mozku přítomen ve většině oblastí a je exprimován hlavně neurony. Syken a kol. (2006) našli u laboratorní myši významné množství tohoto receptoru v kortexu, hipokampu, mozečku a čichových bulbech, s lokalizací především v místech synaptických kontaktů. Naopak Omoto a kol. (2010) uvádějí, že v dospělé CNS (u myši stejné linie) je exprese PirB obecně dosti nízká. Nalezli jej v motorických neuronech *nucleus ruber* a některých motoneuronech v kortexu, v míše ovšem detekovatelný nebyl. Zhou a kol. (2010) našli v míše dospělých potkanů PirB jen v malém množství, ovšem zaznamenali výrazné zvýšení jeho exprese v reakci na poranění.

### **2.1.5. Fylogeneze proteinů retikulonové rodiny**

Geny retikulonové rodiny (zahrnující vysoce konzervativní RTN doménu) jsou evolučně staré, objevují se ve všech kmenech eukaryot. Lze předpokládat, že jejich původ je spjat s evolucí endoplasmatického retikula, čemuž nasvědčuje i jejich absence u prokaryot (Oertle a Schwab, 2003, Yang a Stritmatter, 2007). V některých případech došlo k jejich zmnožení, u obratlovců se tak již vyskytují čtyři odlišné geny (paralogy) této rodiny, u kostnatých ryb je jich dokonce ještě více (Yan a kol., 2006).

Silná inhibice axonální regenerace v CNS (u savců zprostředkovaná mj. i Nogo-A) je mezi obratlovcí netypická a objevuje se až u „vyšších“ obratlovců. U ryb, ocasatých obojživelníků a larválních stádií žab spatřujeme rozsáhlou schopnost regenerace v CNS, která u dospělých žab, plazů, ptáků a savců nemá obdoby (např. plná obnova funkce po přetěti optického nervu či páteřní míchy, regenerace částí mozku). Regenerace je přítomna i u vyšších obratlovců během embryonálního vývoje, u vačnatců dokonce i po porodu, později však mizí (Ferretti a kol., 2003). To potvrzuje představu, že prostředí permissivní pro axonální růst je původním stavem, a teprve druhotně se přeměňuje (v průběhu fylogeneze i ontogeneze) na nonpermissivní.

Gen RTN4 je sice společný všem obratlovcům, neplatí to už ale pro jednotlivé jeho izoformy nebo konkrétní domény. RTN4-A například u ryb zcela chybí (Yang a Stritmatter, 2007), a ostatní jeho produkty se vůbec nepodobají Nogo proteinům vyšších obratlovců, s nimiž sdílejí jen konzervovanou retikulonovou doménu (Diekmann a kol., 2005, Schweigreiter, 2008). Je zajímavé, že receptory pro Nogo proteiny a jiné MAI se u ryb vyskytují, jejich funkční význam a přirozený ligand je však evidentně odlišný než u savců (Klinger a kol., 2004a). Experimentálně bylo ověřeno, že ačkoli rybí axony za normálních okolností regenerují, při pokusech *in vitro* jsou odpuzovány savčími oligodendrocyty, což poukazuje na to, že schopnost reakce na signály MAI zprostředkované těmito receptory je zde již latentně přítomna (Bastmeyer a kol., 1991, Klinger a kol., 2004a).

Bezocasí obojživelníci jsou první skupinou, kde nalézáme exony 1, 2 a 3 genu *nogo*, a tedy i izoformy Nogo-A a B. V souladu s tím jsou dospělci žab nejprimitivnějšími obratlovci, u nichž je CNS pro rostoucí axony nonpermissivním prostředím (Klinger a kol., 2004b). Oertle a kol. (2003a) předpokládají, že exon 3, obsahující oblasti se silnou inhibiční aktivitou, se ve fylogenezi objevil před zhruba 350 miliony let v souvislosti s evolučními změnami při výstupu obratlovců na souš (Oertle a kol., 2003a, b).

Je velmi pravděpodobné, že drastické omezení plasticity dospělé CNS v evoluci obratlovců nebylo samoučelné, ale že bylo nějakým způsobem svázáno s funkčním rozvojem mozku. Přítomnost inhibičních proteinů vázaných na myelin má tedy zřejmě klíčový, byť zatím plně nedoceněný význam ve vývoji a funkci nervové soustavy vyšších obratlovců. Tato skutečnost musí být samozřejmě brána v úvahu při využití blokády Nogo-A k terapeutickým účelům, popřípadě studiu neurovývojových poruch spojených s mutacemi Nogo-A.

## 2.2. Funkce proteinu Nogo-A

### 2.2.1. Nogo-A jako inhibitor axonálního růstu a regenerace

Nogo-A funguje jako inhibitor regenerativního růstu axonů a strukturní plasticity v poškozené zralé CNS (Schwab, 2004, Yiu a He, 2006). Interakcí se specifickými receptory na membráně axonů, prostřednictvím signalizace přes GTPázu Rho a kinázu ROCK, iniciuje kaskádu vedoucí k inhibici axonální regenerace (GrandPré a kol., 2000, Chen a kol., 2000, Prinjha a kol., 2000).

Interakce mezi NgR1 a jeho ligandy, zejména Nogo-66, způsobuje především akutní kolaps růstových kuželů (Chivatakarn a kol., 2007, Kim a kol., 2004), chronickou inhibici axonálního růstu v přítomnosti MAI ovšem zřejmě zprostředkovávají jiné receptory (Chivatakarn a kol., 2007, Zheng a kol., 2005), vážící amino-Nogo a zprostředkující jeho endocytózu a transport do somatu (Joset a kol., 2010, přehled viz Pernet a Schwab, 2012). I v modelu s delecí receptoru NgR1 zůstává zachována inhibice axonálního růstu zprostředkovaná amino-Nogo (Kim a kol., 2004). Zodpovědný je pravděpodobně nově identifikovaný receptor S1PR2 (Kempf a kol., 2014), který se svými vlastnostmi shoduje s očekávaným receptorem pro amino-Nogo, ačkoli nemusí být jediným svého druhu.

Co se akutních inaktivací signalizace zprostředkované Nogo-A týče, byly ověřeny různé experimentální přístupy. Historické prvenství má blokáda Nogo-A specifickými protilátkami. Obzvláště široce byla používána protilátka IN-1, objevená poměrně dlouho před tím, než byla popsána a pojmenována molekula Nogo-A, a dnes je o ní známo, že jejím epitopem je doména amino-Nogo (Caroni a Schwab, 1988b, Bregman a kol., 1995, Brösamle a kol., 2000, Fiedler a kol., 2002, Chen a kol., 2000, Schnell a Schwab, 1990). Kromě pasivní imunizace podáním cizorodé protilátky byly získány zajímavé výsledky i s aktivní imunizací zvířat aplikací Nogo-A nebo peptidy z něj odvozenými (Hauben a kol., 2001, Huang a kol., 1999, Merkler a kol., 2003).

Další osvědčenou metodou je použití syntetického peptidu NEP1-40 odvozeného z proteinu Nogo, blokujícího receptor NgR1 obsazením specifického vazebného místa pro ligand Nogo-66 (GrandPré a kol., 2002). Peptid je účinný i při systémovém (subkutánním) podání (Li a Strittmatter, 2003). Fournier a kol. (2002) vyvinuli rozpustný fragment NgR1 zbavený signální domény (označovaný jako *decoy receptor*), který obsazuje vazebná místa pro buněčný NgR1 (na všech jeho ligandech) a brání tak jeho aktivaci. Analogicky fungují

také fúzní proteiny odvozené z NgR1 (Li a kol., 2004). Účinný je také antagonismus koreceptoru LINGO-1 (Ji a kol., 2006).

Jako efektivní přístup se ukazuje i blokáda členů signálních kaskád napojených na NgR1, například potlačením funkce GTPázy Rho prostřednictvím klostridiové C3 transferázy (Lehmann a kol., 1999) a jejích derivátů (Lord-Fontaine a kol., 2008), nebo inhibicí kinázy ROCK pomocí specifického blokátoru Y-27632 (Fournier a kol., 2003).

Navázání protilátky na Nogo-A, kromě toho, že může fyzicky blokovat místo rozpoznávané receptory, vede také k internalizaci a snížení exprese molekuly Nogo-A (Weinmann a kol., 1998). Exprese Nogo-A je ovšem snížena i po podání peptidu NEP1-40, blokujícího NgR1 (Wang a kol., 2007), nebo obecně kdykoli je zamezeno jeho vazbě na NgR1 (Peng a kol., 2011).

Tyto postupy, vyvinuté obvykle *in vitro* na buněčných kulturách, byly aplikovány také *in vivo*. Obzvláště pozoruhodné jsou výsledky získané u zvířat s lézemi páteřní míchy, kde v řadě případů došlo nejen ke zlepšení regenerace axonů, ale také k zásadní obnově hybnosti (Bregman a kol., 1995, Brösamle a kol., 2000, Fournier a kol., 2003, Li a kol., 2004, Liebscher a kol., 2005, Merkler a kol., 2001, Schnell a Schwab, 1990, Thallmair a kol., 1998). Tyto výsledky byly ověřeny i u primátů (Beaud a kol., 2008, Fouad a kol., 2004, Freund a kol., 2006, 2009). Povzbudivě působí také fakt, že zvýšení regenerativních schopností není provázeno známkami nežádoucích neurologických stavů, jako je spasticita nebo patologická bolest (Freund a kol., 2006, Liebscher a kol., 2005, Lord-Fontaine a kol., 2008). Je však nutné zmínit také existenci studií, které vliv blokády nezaznamenaly (Steward a kol., 2008).

Aplikace protilátek vede k funkční obnově i v modelech mozkové mrtvice (Gilliani a kol., 2010, Papadopoulos a kol., 2002, Seymour a kol., 2005, Tsai a kol., 2011, Wiessner a kol., 2003), a zlepšuje také dorůstání axonů po poškození hipokampu kainátovou lézí (Mingorance a kol., 2004).

Není tedy divu, že blokáda inhibice zprostředkované Nogo-A se stala také předmětem klinických studií na lidských pacientech s poraněním míchy. V roce 2006 byla zahájena první fáze klinického testování protilátky proti Nogo-A (ATI-355; Novartis. ClinicalTrials.gov:NCT00406016), dokončená v roce 2011. Protilátka byla podávána kontinuální intratekální infuzí pacientům s úplnou či neúplnou míšní lézí, a prozatím se zdá, že je bezpečná a organismem dobře tolerovaná (Hawryluk a kol., 2008,

Zörner a Schwab, 2010, Schmandke a kol., 2014). Další skupinou látek s terapeutickým potenciálem jsou inhibitory GTPázy Rho. Experimentálně je používána C3 transferáza, toxin bakterie *Clostridium botulinum*. Pro zlepšení průniku do buňky je používána její rekombinantní verze doplněná o signální sekvenci. Fúzní protein je označován jako BA-210, a stal se základem přípravku Cethrin (BioAxone Biosciences), který již prošel první a druhou fází klinických testů. Aplikuje se na povrch tvrdé pleny míšni během chirurgického zákroku, aktivní složka se pomalu uvolňuje a difunduje na místo léze, což by mělo odstranit problémy spojené s intratekálním podáváním. Podle předběžných výsledků se jeví jako bezpečný a skutečně vede ke zlepšení hybnosti pacientů (Fehlings a kol., 2011, Hawryluk a kol., 2008, McKerracher a Anderson, 2013).

Systém inhibitorů axonálního růstu a jejich receptorů je mimořádně komplikovaný. Kvantitativní a kvalitativní vliv jednotlivých molekul na konečný výsledek, tj. inhibici axonálního růstu a regenerace, vychází velmi odlišně mezi jednotlivými studii. Zatímco akutní inaktivace jednotlivých receptorů nebo některých jejich ligandů (zejména Nogo-A) vedou zpravidla (ne však vždy) k poměrně spolehlivé obnově axonální regenerace, u transgenních modelů jsou výsledky velmi špatně reprodukovatelné, a to zejména *in vivo* (viz následující kapitola).

Zdá se, že spíše než metodická selhání je příčinou právě složitost zkoumaného problému, protože provázaný systém receptorů a ligandů může na zdánlivě stejný zásah reagovat za různých okolností odlišně, zejména v závislosti na použitém zvířecím modelu nebo typu zkoumaných neuronů (viz níže).

Inhibice axonálního růstu přitom není zdaleka tím jediným, co je třeba brát v úvahu. Do hry dále vstupuje také vlastní růstový potenciál neuronů, který je někdy zcela opomíjený, ve skutečnosti však zásadní (Park a kol., 2008). Při poranění je významná i neuroprotektce – v některých případech zásahy mající za cíl zvýšení regenerativních schopností zároveň zvyšují náchylnost neuronů k apoptóze či nekróze (viz kapitola 2.2.4.1 a 2.2.4.2).

### **2.2.1.1. Delece genu *nogo* a axonální regenerace**

Klasickým přístupem pro studium funkce genů a jejich produktů je v moderní biomedicině využití geneticky modifikovaných zvířat, a to zejména takových, u nichž je studovaný gen buď zcela odstraněn, nebo trvale inaktivován. Není tedy divu, že transgenní modely byly použity také při studiu proteinů Nogo a jejich receptorů.



V tomto případě se však ukázala některá omezení tohoto přístupu. Zatímco akutní inhibice signální dráhy spojené s Nogo přináší relativně dobře reprodukovatelné výsledky, genetické delece vedly k nesouhlasným závěrům, kdy i velmi podobná manipulace na podobném animálním modelu vedla k diametrálně odlišnému fenotypu, co se axonální regenerace týče (přehled viz Lee a Zheng, 2012, Zheng a kol., 2006).

V roce 2003 vyšly v časopise *Neuron* tři studie různých vědeckých týmů, popisující myší modely s vyřazením (knockout) Nogo-A a věnující se především vlivu na regeneraci motorických axonů v míše. Simonen a kol. (2003) ze švýcarského Curychu popsali myši se selektivním vyřazením Nogo-A. Tyto myši vykazovaly snížené inhibiční působení myelinu na axony *in vitro*, a odpovídající zlepšení regenerace kortikospinálních axonů *in vivo*, které se ale signifikantně nepromítlo do zlepšení motoriky.

Kim a kol. (2003b), působící na Yaleově universitě v USA, vytvořili dvojitý knockout, s delecí izoform Nogo-A i Nogo-B (dále označen jako alela TRAP). Inhibiční účinky myelinu *in vitro* byly výrazně sníženy, tomu odpovídala rozsáhlá regenerace kortikospinálních axonů *in vivo* a výrazné funkční zlepšení po poranění míchy. Velmi slabá reziduální inhibice byla odstraněna blokádou MAG.

S předešlými dvěma publikacemi je však v ostrém rozporu práce dalšího amerického týmu, Zheng a kol. (2003). Zde byly použity myši s knockoutem dvou (A a B, dále označeno jako alela ATG) i všech tří Nogo izoform. *In vitro* experimenty ukázaly, že myelin knockoutovaných zvířat si uchovává inhibiční vlastnosti, i když slabší než normální myelin. Regenerace axonů *in vivo* i zlepšení motorických funkcí po zranění míchy však nebyly odlišné od kontrol.

Zjevný rozpor mezi těmito pracemi lze vysvětlit různě, byť uspokojivé řešení této otázky nebylo nalezeno dodnes. Příčinou mohou být rozdíly v kritériích axonální regenerace – ve skutečnosti jde o různé procesy, např. pučení kolaterál nepoškozených axonů nad i pod místem léze, pučení poškozených axonů nezasahující pod lézovanou oblast, nebo skutečné regenerativní prorůstání přetátných axonů pod místo poškození (Woolf, 2003). Pro skutečnou obnovu funkce je nutné také vytvoření funkčních synapsí, které je studováno málokdy. Roli mohou hrát i artefakty zobrazovacích metod (Steward a kol., 2007) a věk pokusných zvířat (Cafferty a kol., 2007).

Cafferty a kol. (2007) dále nezávisle porovnávali v rámci jednoho experimentu Nogo-A a B mutanty s alelami TRAP a ATG, a jejich křížence. Zjistili, že homozygoti nesoucí alelu TRAP mají zvýšenou axonální regeneraci, zatímco genotyp TRAP/ATG i ATG/ATG nebyl v tomto ohledu odlišný od kontroly. Poukázali také na to, že i u regenerujících mutantních linií je penetrance fenotypu neúplná – regeneruje jen část vláken, a to ještě ne u všech jedinců, což ukazuje na komplexnost zkoumané problematiky.

K dalším faktorům určujícím, zda se regenerativní fenotyp objeví nebo ne, patří typ poranění míchy (Cafferty a Strittmatter, 2006), patrně kvůli různému rozsahu astrogliové jizvy exprimující CSPG a různému charakteru odlišných nervových drah.

Práce Dimou a kol. (2006) z pera švýcarského týmu odhalila další možné příčiny nesouhlasných výsledků: Transgenní linie vycházely z chimérických zakladatelů, a co do genového pozadí se jednalo o nedefinované hybridy dvou kmenů s vysokou individuální variabilitou. Přitom mezi myšími kmeny existují přirozené a velmi výrazné rozdíly v expresi Nogo-A a B, spontánním regeneračním potenciálu neuronů, vzniku zánětů po poranění CNS i tendenci k tvorbě gliové jizvy s CSPG. Vliv genového pozadí na projev experimentálních manipulací je proto dramatický.

Další revizi původního problému provedli Lee a kol. (2009) ze Zhengova týmu. Porovnali mutanty s alelou TRAP (Kim a kol., 2003b) a zcela nového trojitého mutanta s delecí všech tří izoform Nogo. V rozporu s výše uvedenými pracemi nenalezli u zvířat s alelou TRAP žádné známky regenerace kortikospinálního traktu, ani zlepšení motoriky po zranění míchy. Totéž pozorovali i u zvířat zcela bez Nogo proteinu. Rozpor s pracemi blokujícími Nogo pomocí protilátek, kde byl proregenerativní efekt zpravidla silný, vysvětlují buď jejich akutností, anebo imunitními mechanismy, které snad mohly být aktivovány přítomností protilátek, na rozdíl od genové delece. Trojitá delece popsaná v této práci ovšem vyvolala zvýšenou neuroplasticitu a pomalejší rozvoj demence v modelu Alzheimerovy choroby (Masliah a kol., 2010).

Následná práce (Lee a kol., 2010) dospěla k závěru, že delece kteréhokoli ze tří hlavních MAI (Nogo, MAG a OMgp) zvýší axonální pučení, nikoli však růst na delší vzdálenosti. Nedochází ale k vzájemné synergii u vícenásobné delece v jednom organismu, ani k projevům funkčního zotavení po různých typech míšních lézí. Cafferty a kol. (2010) dospěli s obdobným modelem (delece stejných tří MAI) opět ke zcela opačným závěrům. Zjistili, že samotná delece Nogo-A silně oslabí inhibiční vlastnosti myelinu. Trojí delece všech MAI potom myelinovou inhibici prakticky eliminuje. Při experimentech *in vivo* (dorzální hemisekce) delece Nogo-A dovolila regeneraci axonů kortiko- i rafespinalního

traktu i se zotavením na behaviorální úrovni, trojí souběžná delece pak měla vůbec největší dopad.

Regeneraci a plasticitě v mozku (na rozdíl od míchy) se věnuje menší množství prací, nicméně závěry zde byly zajímavé. Absence Nogo-A a B, či jen Nogo-A v akutní fázi poškození zhoršuje následky traumatického poškození mozku (Marklund a kol., 2009) a ischemie s následnou reperfúzí (Kilic a kol., 2010). Škodlivý vliv genových delecí se přitom promítal jak do poškození tkáně, tak i funkce na behaviorální úrovni. Zdá se tedy, že Nogo-A má neuroprotektivní úlohu, a jeho blokáda či absence v průběhu akutní fáze zranění či ischemie může následky spíše zhoršit. Tento mechanismus se může podílet na nejednoznačných výsledcích, které byly s konstitutivními delecemi Nogo-A získány v modelech poranění míchy (kde by snížené přežívání axonů působilo protichůdně k jejich zvýšené regeneraci). Závažné důsledky pro praktickou aplikaci léčebných postupů namířených proti signalizaci Nogo-A jsou nasnadě.

Teng a Tang (2005) argumentují, že systém signalizace přes Nogo-A a NgR1 může být ve skutečnosti důležitý pro určité aspekty neuronální regenerace, a jeho úplná delece je proto kontraproduktivní. Je možné, že *in vivo* může docházet k řízené regulaci této signalizace. Skutečně jsou známi přirození antagonisté NgR1 (Sato a kol., 2011, Thomas a kol., 2010) a také fyziologický vznik peptidů blokujících Nogo-66 (Walmsley a kol., 2004). Experimentální anti-NgR1 a anti-Nogo-A terapie dost možná jen napodobuje tyto fyziologické mechanismy.

Jeden z hlavních problémů studia signalizace spojené s Nogo-A je ten, že systém má spíše podobu sítě než přímočaré kaskády, uplatňují se v něm přinejmenším tři receptory (a řada koreceptorů), schopné vázat celou řadu rozmanitých ligandů. Jednotlivé molekuly tedy mohou být a podle všeho i jsou do značné míry zastupitelné (viz obr. 3).

Dále je při konstitutivní delecí určitého genu třeba počítat s kompenzačními změnami v expresi ostatních, které skutečně byly v mnoha studiích popsány (Cafferty a Strittmatter, 2010, Dimou a kol., 2006, Kempf a kol., 2013, Simonen a kol., 2003), což znemožňuje přímočaré srovnání s akutní blokadou daného členu signální kaskády.

V neposlední řadě, situace může být velmi odlišná v závislosti na genetickém pozadí modelového organismu (druh, kmen, individuální variabilita) anebo studovaném buněčném typu, roli může hrát i věk. Všechny tyto faktory mohou ovlivňovat vlastní regenerační potenciál samotných neuronů i jeho citlivost na různé typy signálů.

Na metodická úskalí spinálních lézí a hodnocení jejich výsledků poukazují Lee a Zheng (2012). U částečných lézí je vždy problém rozlišit axony, které byly přerušeny a regenerovaly, od těch, které se při chirurgickém zákroku přerušit nepodařilo. Tato nejistota sice u úplných transekcí odpadá, bohužel však v tomto případě bývá regenerace pozorována jen zřídka. Zásahy, jako jsou genové inaktivace a podání protilátek, mohou ve skutečnosti působit na nepřerušené axony, např. ovlivněním jejich přežívání nebo větvení a pučení po provedení léze. Klíčové je tedy odlišení pučení nepoškozených axonů od regenerace těch přetátných – oba tyto jevy se sice podílejí na funkčním zotavení CNS, jsou však rozdílné. Zcela nezávisle na nich pak mohou působit změny synaptické síly, rovněž ovlivnitelné zablockováním Nogo-A či NgR1.

### **2.2.1.2. Inaktivace NgR1, PirB a S1PR2 a axonální regenerace**

Genetické inaktivace receptoru NgR1 představují velmi lákavý terapeutický cíl, protože by měly eliminovat či omezit vliv celé řady inhibitorů axonálního pučení a růstu, které jeho prostřednictvím působí. Bohužel ani v tomto případě nevedlo použití transgenních modelů k jednoznačným odpovědím, a výsledky byly podobně rozporuplné jako v případě knockoutů genu *nogo*.

Kim a kol. (2004) popsali jako vůbec první vyřazení genu pro NgR1 u myši. Neurony těchto myši byly schopny růst v přítomnosti řady inhibitorů (Nogo-66, MAG, OMgp, myelin). *In vivo* po zranění míchy u nich nebyla zjištěna regenerace CST, ovšem rubrospinální a rafespinální vlákna dorůstala ve zvýšené míře. Významné bylo i zlepšení motorických funkcí po jednostranném i úplném přetěti míchy, srovnatelné s akutními inhibicemi Nogo-A či jeho receptoru, navíc beze stop neuropatické bolesti. Autoři zmiňují i další (nepublikované) experimenty, jež ukázaly, že popsaný transgenní model vykazuje po úplném přetěti míchy výraznější funkční zlepšení než myši s vyřazeným Nogo-A a B, nebo potkani s aplikací peptidu NEP1-40. U téže linie myši s vyřazeným NgR1 bylo pozorováno také zlepšené zotavení motoriky po mozkové mrtvici (Lee a kol., 2004) a změny v synaptické plasticitě, ovlivňující dynamiku paměťových stop (Akbik a kol., 2013).

Zheng a kol. (2005) u odlišné linie myši s knockoutem NgR1 nenalezli zvýšenou regeneraci axonů *in vivo* ani funkční zlepšení po transekcii míchy. Při experimentech *in vitro* neměla absence NgR1 žádný odtlumující efekt, neurony ganglií zadních kořenů míšních reagovaly zcela normálně i na izolovaný ligand Nogo-66. Výsledky ukázaly, že vedle NgR1 existují ještě další receptory detekující Nogo-A. Alespoň v tomto posledním ohledu se závěry shodují s Kim a kol. (2004).

Wang a kol. (2011b) zkoumali vliv podmíněné genetické delece NgR1 u myši po zranění míchy. Důležitá je hlavně skutečnost, že potlačení exprese NgR1 bylo indukováno teprve 8 týdnů po zranění. Navzdory chronickému charakteru poškození hybnosti a opožděnému zásahu bylo v tomto případě zjištěno funkční zlepšení. Dobrý výsledek přinesla i akutní blokáda NgR1 signalizace pomocí fúzního proteinu odvozeného od NgR1. Tento výsledek je zajímavý především proto, že protilátkové zásahy proti Nogo-A bývají účinné jen během krátkého období (několik dnů nebo nanejvýš jeden týden) po poranění CNS (přehled viz Pernet a Schwab, 2012).

Hanell a kol. (2010) se zaměřili na traumatické poškození mozku u myši s akutní inhibicí či genetickou delecí NgR1 (linie popsána Kim a kol., 2004). Výsledky ukázaly, že blokáda NgR1 sice zvyšuje pučení hipokampálních axonů, nikoli však v poraněném mozku. Oba způsoby potlačení signalizace přes NgR1 nejenže nevedly ke zlepšené obnově kognitivních funkcí, ale dokonce způsobily prohloubení deficitu vyvolaného zraněním. Motorické zotavení blokáda NgR1 neovlivnila prakticky vůbec. Tyto výsledky jsou v rozporu s pracemi demonstrujícími pozitivní efekt akutní blokády NgR1 či Nogo-A po úrazech mozku. Možným vysvětlením je, že v této práci byla aktivita NgR1 potlačena konstitutivně, nebo velmi záhy po zranění, nepříznivý výsledek je tedy možné přičíst na vrub potlačení neuroprotektce zprostředkované Nogo-A v akutní fázi poškození, která byla demonstrována v pracích Marklund a kol. (2009) a Kilic a kol. (2010).

Dickendesher a kol. (2012) použili zajímavý transgenní model s delecí všech tří izoform NgR. Demonstrovali, že trojí mutanti s vyřazením NgR1, 2 a 3 i dvojití mutanti s vyřazením NgR1 a 3 vykazují zvýšenou regeneraci axonů optického nervu. Vyřazení kterékoli jedné izoformy pro úspěšnou regeneraci nepostačovalo, což může objasňovat dřívější nejednoznačné výsledky získané potlačením pouze izoformy NgR1.

Experimentů s genetickou delecí receptoru PirB je už vzhledem k jeho relativně pozdnímu objevu mnohem méně. Atwal a kol. (2008) uvádějí, že zablokování PirB nebo jeho genetická delece výrazně (ne však zcela) tlumí myelinovou inhibici axonálního růstu *in vitro*, podle uvedených výsledků je inhibice zprostředkovaná PirB důležitější než v případě NgR1. Při současné blokáde PirB a NgR1 je odtlumení skoro úplné. Jistý vliv ligandu Nogo-66 však přetrvává, což poukazuje na přítomnost dalších receptorů.

Omoto a kol. (2010) nepozorovali po vyřazení PirB změny v kortikální plasticitě ani chování po poranění mozkové kůry. Nakamura a kol. (2011) nezjistili u myši s knockoutem PirB zvýšenou regeneraci axonů ani behaviorální zotavení po hemisekci míchy,

kupodivu ani tehdy, když u nich byl zablokován receptor NgR1. Podobně negativní výsledky získali Fujita a kol. (2011) po rozdrčení zrakového nervu.

Adelson a kol. (2012) ukázali, že vyřazení PirB snižuje rozsah poškození a zlepšuje zotavení v modelu mozkové mrtvice. Syken a kol. (2006) a Djuricic a kol. (2013) po vyřazení PirB našli zvýšenou plasticitu okulární dominance a také zvýšení synaptické plasticity na úrovni neuronů.

Vliv blokady nebo genové delece nově objeveného receptoru S1PR2 (Kempf a kol., 2014) nebyl prozatím zkoumán v podmínkách *in vivo* – jedná se o perspektivní oblast pro budoucí výzkum.

Závěrem tohoto přehledu může být, že celý systém zprostředkující inhibici axonálního růstu je vysoce redundantní a vyřazení některé jeho složky se vůbec nemusí fenotypově projevit, nebo se alespoň neprojeví za všech okolností (jak ukazuje variabilita výsledků mezi jednotlivými laboratořemi, nebo dokonce i mezi jedinci v rámci jednoho experimentu). Interpretace získaných výsledků je tedy velmi obtížná, ba v mnoha případech bez dalších dat nemožná.

### **2.2.2. Nogo-A ve vývoji CNS**

Role, kterou Nogo-A (a s ním funkčně spojené receptorové systémy) hraje v inhibici axonální regenerace po zranění mozku či míchy, jistě neodráží jeho primární funkci v organismu. Jednou z důležitých funkcí systému inhibice axonálního růstu je jeho role v regulaci pre- i postnatálního vývoje CNS. Podílí se na procesech tak rozmanitých, jako je diferenciace a migrace buněk, tvorba a stabilizace myelinových pochev, a omezení neuroplasticity při dozrávání CNS.

V rané embryogenezi exprese Nogo-A koinciduje se vznikem neurální ploténky a diferenciací ektodermálních buněk v neurální prekurzory, a v pozdějších fázích se podílí na propojování projekčních neuronů během formování axonů a synaptogeneze. Působení Nogo-A ve vývoji mozku (kdy je exprimován hlavně neurony) se zřejmě děje nezávisle na receptorech NgR1, které v prenatalním a časném postnatálním vývoji v neuronech zpravidla chybějí (Caltharp a kol., 2007, Wang a kol., 2002b).

V dospělých neuronech je sice Nogo-A někdy přítomen, většinou však v relativně malém množství. Naopak ve vyvíjejících se neuronech různých typů spatřujeme rozsáhlou expresi Nogo-A (Huber a kol., 2002, Josephson a kol., 2001, Oertle a kol., 2003b,

Richard a kol., 2005, Willi a kol., 2010). Signalizace spojená s proteiny Nogo reguluje migraci buněk, stejně jako růst, větvení a vzájemnou adhezi rostoucích neuritů v různých embryonálních tkáních (Fournier a kol., 2002, Mathis a kol., 2010, Mingorance-Le Meur a kol., 2007, Petrinovic a kol., 2010). Nogo-A se podílí také na navádění axonů (Schwab a Schnell, 1991, Wang a kol., 2008, Wang a kol., 2010b) a účastní se interakcí mezi axonem a oligodendrocyty, vedoucích k formaci myelinové pochvy, jak ukazují abnormality v diferenciaci oligodendrocytů a myelinizaci axonů u Nogo-A deficientních myši (Chong a kol., 2012, Pernet a kol., 2008).

V nezralé CNS savců obecně spatřujeme vyšší potenciál neuronů k regeneraci a plasticitě, navzdory tomu, že Nogo-A tam již přítomen je (Ferretti a kol., 2003, Oertle a kol., 2003a).

Mingorance a kol. (2004) ukázali, že ačkoli je ve vyvíjejícím se hipokampu myších embryí Nogo-A přítomen, nepůsobí inhibičně na vyvíjející se neurony, které dosud neexprimují NgR1.

V míše třináctidenních kuřecích embryí se nalézá jak Nogo-A, tak NgR1, a ani po zranění nedochází ke snížení jejich exprese, navzdory tomu však k regeneraci dojde. Lokalizace těchto proteinů je zde ale odchylná od zralé CNS, protože NgR1 je lokalizován na tělech neuronů a Nogo-A v axonech, nikoli v gliových buňkách (O'Neill a kol., 2004). Neuronální exprese Nogo-A vyvolaná v dospělosti skutečně může regenerativní potenciál neuronu zvýšit (Pernet a kol., 2012).

Dozrávání CNS, spojené s myelinizací, ovšem schopnost axonálního růstu a plasticity obecně značně snižuje. Přinejmenším zčásti za to odpovídá Nogo-A v membránách myelinových pochev oligodendrocytů, interagující s NgR1, který se v postnatálním vývoji objevuje na axonálních membránách (Mingorance a kol., 2004, Wang a kol., 2002b). Pokud je tato signalizace blokována, dochází k obnovení schopnosti regenerace, ale i plasticity (viz např. Akbik a kol., 2013). Přejít od neuronů vyvíjející se CNS, které dobře regenerují a nejsou inhibovány MAI, k neuronům zralým, které působení MAI podléhají a i jejich vlastní regenerativní potenciál je menší, však nelze omezovat jen na interakci Nogo-A-NgR1. Roli hrají i vnitřní procesy v neuronu, spojené s poklesem hladiny cAMP a proteinkinázy A, které řídí regenerativní potenciál a určují i odpověď neuronu na signály MAI (Cai a kol., 2001).

Zdá se, že Nogo proteiny hrají důležitou roli v omezení růstu a pučení axonů ve zralé CNS, konsolidaci neurálních spojení vytvořených během vývoje a jejich stabilizaci (přehled viz Willi a Schwab, 2013, Zagrebelsky a kol., 2010).

Proteiny Nogo a jejich receptory, krom toho, že inhibují axonální růst, zasahují také do další oblasti významné jak pro vývoj mozku, tak pro regenerativní medicínu, totiž do mechanismů diferenciací kmenových buněk. Neurální kmenové buňky v mnoha oblastech mozku pre- i postnatálně exprimují NgR1 a Nogo-A. Signály v podobě Nogo-A a MAG zvyšují u neurálních kmenových buněk pravděpodobnost diferenciací na astrocyty, a naopak potlačují diferenciaci v neurony. Proto pokud je při aplikaci neurálních kmenových buněk do poraněné míchy zároveň blokován NgR1, dojde ke zvýšené diferenciaci na neurony a funkčnímu zlepšení (přehled viz Borrie a kol., 2012). Signalizace přes Nogo-66 a NgR1 reguluje neurogenezi v subventrikulární zóně, signál v podobě domény Nogo- $\Delta$ 20 potom nezávisle na NgR1 podporuje migraci neuroblastů do čichového bulbu (Rolando a kol., 2012).

### **2.2.3. Nogo-A jako regulátor synaptické plasticity**

Expresí Nogo-A v neuronech, vysoká během vývoje mozku, obvykle klesá po porodu. Pozoruhodnou výjimkou jsou ale neurony těch oblastí mozku, které si i v dospělosti uchovávají značnou míru plasticity. Jedná se především o hipokampální pyramidové buňky a interneurony (Huber a kol., 2002, Meier a kol., 2003, Mingorance a kol., 2004, Wang a kol., 2002b), které mají zároveň i vysokou expresi NgR1 (Josephson a kol., 2003). Nogo-A se v těchto neuronech objevuje především v místech synaptických kontaktů (Aloy a kol., 2006, Lee a kol., 2008, Liu a kol., 2003, Wang a kol., 2002b). Dnes už je známo, že zde plní roli významného regulátoru synaptické plasticity, a společně s dalšími molekulami pomáhá udržovat její optimální míru. Zabraňuje tvorbě nadbytečných synapsí, a ty již vytvořené stabilizuje (Delekate a kol., 2011, Zagrebelsky a kol., 2010). Nadbytek Nogo-A může vést k destabilizaci či úplnému zániku synapsí (Aloy a kol., 2006). V hipokampu se sice vyskytují i ostatní izoformy Nogo (Meier a kol., 2003), nejsou ale přítomny na synapsích (Raiker a kol., 2010).

Synaptická lokalizace byla popsána i v případě NgR1, a je možné, že signalizace Nogo-A/NgR1 působí na synapsích obousměrně (Zagrebelsky a kol., 2010). Wills a kol. (2012) ukázali význam signalizace přes receptory NgR1, 2 a 3, které omezují počet synapsí ve vyvíjejícím se hipokampu. Na synapsích však najdeme také receptor PirB, jenž je rovněž významným stabilizátorem neuronálních obvodů (Syken a kol., 2006).



Nogo-A a jeho receptory modulují synaptickou plasticitu závislou na aktivaci neuronu, jak ukazuje celá řada experimentů.

Nogo-A v hipokampu potlačuje dlouhodobou potenciaci (LTP) prostřednictvím domény Nogo-66 (Raiker a kol., 2010), i nezávislým mechanismem působícím přes doménu Nogo- $\Delta$ 20 a receptor S1PR2 (Kempf a kol., 2014). Zablokování Nogo-A specifickou protilátkou, nebo jeho genetická delece, usnadňuje vytvoření LTP a zvyšuje i její sílu, přičemž efekt akutní blokády je výraznější (Delekate a kol., 2011). Podobný vliv může mít i blokáda či genová delece NgR1 (Delekate a kol., 2011, Lee a kol., 2008, přehled viz Schwab, 2010), která rovněž vyvolá posílenou LTP a naopak oslabenou dlouhodobou depresi (LTD) v hipokampu. Srovnatelně na procesy LTP a LTD působí delece PirB v kortikálních neuronech (Djurisic a kol., 2013), překvapivě však nikoli v hipokampu (Raiker a kol., 2010). Blokáda S1PR2 také zvyšuje míru LTP (Kempf a kol., 2014).

Procesy dlouhodobé potenciace se považují za elektrofyziologický korelát tvorby paměťových stop (Whitlock a kol., 2006, přehled viz Stuchlík, 2014), a skutečně nadměrná exprese NgR1 může vést k poškození dlouhodobé paměti i na behaviorální úrovni (Karlén a kol., 2009).

Důležité je, že míra inhibice zprostředkovaná NgR1 je sama o sobě závislá na aktivaci neuronů, potažmo synapsí. Exprese NgR1 v hipokampálních a kortikálních neuronech po podání excitotoxických látek nebo fyzické aktivitě přechodně klesá (Josephson a kol., 2003, Meier a kol., 2003, Mingorance a kol., 2004, Wills a kol., 2012). Pokles exprese NgR1 je alespoň *in vitro* spojen také s poklesem Nogo-A a naopak zvýšenou expresí podjednotek glutamátových receptorů (Peng a kol., 2011). Tento mechanismus může být spoluzodpovědný za formování paměťových stop, nebo patologickou neuroplasticitu v epilepsii.

Na subcelulární úrovni lze pozorovat, že genová delece NgR1 zvyšuje dynamiku vzniku a zániku (obrat) dendritických trnů a axonálních varikosit v somatosenzorické kůře, ačkoli nemění jejich celkové množství ani hustotu. U normálních myší je tento typ plasticity potlačen ve věku 26 dnů (v souvislosti s dozráním myelinu a zvýšenou přítomností MAI), u myší s genovou delecí k tomu ovšem nedojde. Indukcí genové delece v dospělosti lze tuto morfologickou plasticitu vyvolat i v jednom roce věku. Velmi pravděpodobně jde přitom o efekt signalizace Nogo-A-NgR1, protože blokáda Nogo-A vyvolá podobné změny (Akbik a kol., 2013). Pozorovaná plasticita je přitom závislá na sensorických vstupech, signalizace přes NgR1 tedy reguluje vliv zkušenosti na neuronální morfologii (Akbik a kol., 2013).

PirB je také regulátorem dendritické morfologie v kortikálních buňkách – jeho delece zvýší jak početnost, tak stabilitu synaptických trnů, a zvyšuje sílu synapsí (Djurisic a kol., 2013).

Nogo-A a NgR1 regulují též morfologii axonů i dendritických stromů hipokampálních buněk a zrání místních dendritických trnů (Zagrebelsky a kol., 2010). Při jejich zablokování dochází k morfologickým změnám a zachování strukturální plasticity v hipokampu do vyššího věku (Zagrebelsky a kol., 2010).

Důležitým modelem dlouhodobé kortikální plasticity je plasticita okulární dominance. Ve zrakové kůře savců se vyskytují sloupce, zpracovávající vstupy pocházející vždy z jednoho oka. K jejich zformování dochází již během nitroděložního vývoje, ovšem během senzitivní periody po porodu zůstávají nadále plastické. Pokud dojde v tomto období k sensorické deprivaci nebo dokonce enukleaci jednoho oka, jemu příslušné sloupce se začnou zmenšovat na úkor oblastí zpracovávající signály z funkčního oka. V dospělém mozku tato forma plasticity mizí. Je pozoruhodné, že plasticita okulární dominance je zachována i v dospělosti u zvířat s vyřazeným genem pro NgR1 (McGee a kol., 2005) nebo PirB (Syken a kol., 2006, Djurisic a kol., 2013) či po akutní blokádě NgR1 (Luo a kol., 2011). To jasně ukazuje, že oba receptory (a jejich ligandy) jsou zásadní pro stabilizaci architektury neuronových sítí a omezení plasticity v důsledku vnějších podnětů. Je zajímavé, že podobný efekt může mít i zablokování jiných inhibitorů axonálního růstu, například CSPG (Pizzorusso, a kol., 2002). Blokáda inhibitorů neuroplasticity by se proto mohla uplatnit v léčbě tupozrakosti (Luo a kol., 2011).

Zablokování Nogo-A povzbuzuje také kompenzační neuroplasticitu po poškození CNS. V mnoha případech, např. po míšních lézích, je velmi obtížné od sebe oddělit regeneraci (ve smyslu dorůstání poškozených axonů) od neuroplasticity (přizpůsobení existujících nervových buněk či axonů novým funkcím). Funkční reorganizaci v mozkové kůře po kontralaterální lézi podpořenou podáním protilátky IN-1 popsali Emerick a kol. (2003).

Zablokování funkce Nogo-A může ovšem i bez dalších experimentálních zásahů vyvolat abnormální růst axonů v intaktní CNS, například kortikospinálních vláken (Bareyre a kol., 2002) nebo u Purkyňových buněk mozečku (Buffo a kol., 2000).

V celkovém pohledu se tedy zdá, že Nogo-A, ostatní MAI a s nimi spojené receptory pomáhají v dospělé CNS udržovat stabilní anatomické uspořádání a konektivitu a brání nežádoucím přestavbám neuronových sítí. Tam, kde je jistá míra plasticity zapotřebí, tedy zejména v procesech učení a paměti, dochází k útlumu exprese NgR1 a tím i dočasnému odtlumení plasticity.

## **2.2.4. Další funkce Nogo proteinů a retikulonů obecně**

### **2.2.4.1. Apoptóza**

Retikulonové proteiny RTN1-C a RTN4-B (Nogo-B, RTN-XS), lokalizované v endoplasmatickém retikulu, se mohou vázat na antiapoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-XS, snižovat jejich aktivitu a tím zvyšovat pravděpodobnost apoptózy (Tagami a kol., 2000). Naopak vazba mezi RTN3 a Bcl-2 působí antiapoptoticky (Wan a kol., 2007).

Gen *nogo* (zejména jeho produkt Nogo-B) může mít proapoptotické účinky v rakovinných buňkách, a dokonce selektivně vést k apoptóze rakovinných, ale nikoli normálních buněk, a v některých nádorech je jeho exprese přirozeně potlačena. Je proto někdy považován za možný tumor-supresorový gen (Li a kol., 2001, Qi a kol., 2003, Watari a Yutsudo, 2003). Proapoptotické působení Nogo-B v modelu rakoviny nicméně nepotvrdili Oertle a kol. (2003d).

Uměle zvýšená exprese Nogo-C může indukovat apoptózu u HEK293 buněk (Chen a kol., 2006). Naopak zvýšená exprese Nogo-A a B či RTN3 vede k potlačení apoptózy a zvýšenému přežívání neuroblastomových buněk (Teng a Tang, 2013).

Nogo-A je v některých případech ve zvýšené míře exprimován v místě či okolí léze CNS (Cheatwood a kol., 2008, Pernet a kol., 2012), a v řadě případů je podezírán z regulace apoptózy. Je známo, že GTPáza Rho-A, významný člen signální kaskády spojené s MAI a jejich receptory, má pro apoptózu velký význam – její aktivace se zvyšuje až desetinásobně po zranění CNS a může vést k buněčné smrti. Zablokování této aktivity naopak chrání buňky proti apoptóze (Dubreuil a kol., 2003). Pernet a kol. (2012) však neukázali výrazný vliv umlčení či delece Nogo-A na průběh apoptózy po zranění optického nervu, naopak pozorovali, že vyšší exprese neuronálního Nogo-A zde (poněkud paradoxně) podporuje regeneraci.

#### 2.2.4.2. Neuroprotektivní působení

Existují důkazy, že v podmínkách ischemického nebo oxidativního stresu může Nogo-A hrát neuroprotektivní roli (přehled viz Pernet a Schwab, 2012). Blokáda či delece Nogo-A v akutní fázi ischemického poškození mozku zhoršuje přežívání neuronů (Kilic a kol., 2010). Podobně negativní efekt genové delece Nogo-A lze pozorovat při traumatickém poškození mozku (Marklund a kol., 2009). Je třeba nicméně podotknout, že v řadě studií takový efekt pozorován nebyl (viz kapitola 2.3.5)

V buněčné kultuře nezralých kortikálních neuronů vykazuje peptid odvozený z amino-Nogo (nesoucí aminokyseliny 290-562 z proteinu Nogo-A) začleněný ve fúzním proteinu protektivní účinek proti oxidativnímu poškození peroxidem vodíku, pravděpodobně díky interakci s enzymy vychytávajícími volné radikály (Mi a kol., 2012). Umělé snížení exprese Nogo-A vede naopak k vyšší citlivosti na volné radikály a zvýšenému odumírání buněk. Přitom spontánní exprese Nogo-A v buňkách vystavených oxidativnímu stresu klesá (Mi a kol., 2012). Fúzní peptid odvozený z amino-Nogo vykazoval neuroprotektivní účinky také v modelech ischemie, jako je kyslíková a glukózová deprivace hipokampálních neuronů *in vitro*, kde zlepšil přežívání neuronů, chránil je před apoptózou a snížil hladiny volných radikálů (Guo a kol., 2013a). Podobně také *in vivo*, v modelu okluze *arteria cerebri media*, došlo po jeho aplikaci k menšímu úbytku neuronů, menší aktivitě volných radikálů, zmenšení poškozené oblasti a zlepšení neurobehaviorálního skóre (Guo a kol., 2013b).

Yang a kol. (2009) zaznamenali protektivní působení Nogo-A v modelu amyotrofické laterální sklerózy (podrobněji viz kapitola 2.3.3.). Nogo-A zde mění distribuci protein disulfid izomerázy, která pomáhá při skládání (foldingu) proteinů obsahujících disulfidické můstky a plní tak úlohu chaperonu.

Protektivní role není specifická jen pro savčí retikulony. Wakefield a Tear (2006) popsali významný pokles délky života u octomilky s delecí genu *Rtn11*, jediného retikulonového genu, který je u hmyzu přítomen.

Celkově lze říci, že ačkoli přítomnost Nogo proteinů není pro buňku životně důležitá, jak ukazují četné práce s genovými delecemi, může se jejich absence negativně projevit ve stresových podmínkách. Mechanismem by mohla být změněná reakce endoplasmatického retikula na stresové podmínky (Teng a Tang, 2008).

### 2.2.4.3. Ostatní funkce nogo proteinů a dalších retikulonů

Retikulonové proteiny se typicky vyskytují, jak už název napovídá, v endoplasmatickém retikulu, zejména jeho periferní, tubulární části. Hrají významnou roli v udržování jeho morfologie (Audhya a kol., 2007, Voeltz a kol., 2006), a též při jeho reakci na buněčný stres (Teng a Tang, 2008). Důležité jsou i při utváření jaderného obalu (Anderson a Hetzer, 2008, Kiseleva a kol., 2007).

Uvažuje se i o dalších jejich funkcích v procesech, jako je endocytóza (Iwahashi a Hamada, 2003), transport váčků a jejich exocytóza (Steiner a kol., 2004, Wakana a kol., 2005, Yan a kol., 2006), transport proteinů v rámci buňky (Liu a kol., 2008) a translokace proteinů přes membránu (Zhao a Jantti, 2009). (Přehled viz Prior a kol., 2010.)

Protein Nogo-B prostřednictvím specifického receptoru NgBR (Miao a kol., 2006, Schwab, 2010) zastává významnou funkci v cévách, kde se za normálních okolností nalézá v buňkách endotelu a hladkého svalstva. Zprostředkuje remodelaci a morfogenezi cév, zejména migraci endotelových buněk a vaskulárního hladkého svalstva, a podporuje jejich vzájemnou adhezi (Acevedo a kol., 2004). Zajímavá je skutečnost, že genetická delece Nogo-B vyvolává patologické změny v regenerujících cévách, zejména expanzi intimy, vedoucí až k cévní okluzi (Acevedo a kol., 2004). Yu a kol. (2009) ukázali, že exprese Nogo-B se zvyšuje při ischemii a je nezbytný pro obnovu krevního průtoku v ischemizovaných oblastech. Navíc podporuje hojení poškozených tkání a motilitu makrofágů. Remodelaci cév ovlivňuje také prostřednictvím interakce s receptorem PirB, která infiltraci makrofágů naopak omezuje (Kondo a kol., 2013).

Nogo-B v játrech zvyšuje proliferaci hepatocytů a urychluje regeneraci tkáně (Gao a kol., 2013). Bonal a kol. (2013) popsali expresi Nogo-A v  $\beta$ -buňkách pankreatu. Zjistili, že genová delece nebo akutní inaktivace Nogo-A vede ke zvýšené sekreci inzulínu a poklesu hladiny glukózy, a mohla by být tedy terapeuticky využita u diabetu 2. typu.

## 2.3. Nogo proteiny a další retikulony v patologických procesech

### 2.3.1. Retikulony v patologii Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba je typická pro osoby v pokročilejším věku, u nichž je nejběžnějším druhem demence. Projevuje se rychlým progresivním zhoršováním paměti, prostorové navigace a kognitivních schopností obecně, které vede až k rozpadu osobnosti, neschopnosti vykonávat i ty nejjednodušší úkony a nakonec ke smrti. V mozcích pacientů se objevují amyloidní plaky a neurofibrilární klubíčka, někdy i Lewyho tělíška, a dochází k rozsáhlému odumírání neuronů a úbytku synapsí. V blízkosti amyloidních plaků se objevuje i aberantní neuroplasticita (axonální pučení), jejíž funkční význam není jasný.

Choroba byla popsána německým lékařem Aloisem Alzheimerem již v roce 1906, dodnes však – navzdory dlouholetému úsilí neurobiologů a velkému objemu získaných dat – nevíme téměř nic o jejích příčinách, a její průběh lze i s pomocí nejmodernějších léků toliko brzdít, ne však zastavit či zvrátit. V současnosti představuje Alzheimerova demence (AD) stále závažnější problém vzhledem ke stárnutí populace vyspělých zemí a tím i stoupajícím počtům pacientů.

Hlavním projevem AD je nadměrná produkce a oligomerizace peptidu amyloidu- $\beta$  ( $A\beta$ ), který toxicky působí na okolní buňky a je schopen dále agregovat a tvořit amyloidní plaky. Tyto plaky bývají obklopeny dystrofickými neurity, aktivovanými mikroglie a reaktivními astrocyty. Podle tzv. amyloidové hypotézy vzniku AD je právě oligomerizace a agregace  $A\beta$  příčinou ostatních patologických projevů.

$A\beta$  vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP) prostřednictvím enzymu  $\beta$ -sekretáza1 neboli BACE1 (*beta-amyloid converting enzyme 1*), který tak představuje důležitý článek v celé patologii AD. BACE1 interaguje s RTN proteiny, které působí snížení  $\beta$ -sekretázové aktivity (nejvýrazněji v případě RTN3) a omezují tvorbu  $A\beta$  (He a kol., 2004, Murayama a kol., 2006, Teng a Tang, 2008). Vazba na BACE1 je patrně zprostředkována C-koncem RTN proteinů (Yan a kol., 2006). V myším modelu AD skutečně vede zvýšená exprese RTN3 ke sníženému hromadění  $A\beta$  v kůře a hipokampu, s výjimkou oblasti CA1 (Shi a kol., 2009a). Možným mechanismem je sekvestrace navázané BACE1 v endoplasmatickém retikulu, anebo znemožnění její vazby na APP (přehled viz Prior a kol., 2010, Yan a kol., 2006).

Protektivní efekt RTN proteinů má ale i stinné stránky. Samotný RTN3 u myši s jeho zvýšenou expresí agreguje, což vede ke vzniku dystrofických neuritů v hipokampu (zejména CA1 oblasti) i k uvolnění jeho inhibičního vlivu na BACE1 (Hu a kol., 2007, Shi a kol., 2009a). Agregace RTN3 tak u myšního modelu smazává pozitiva plynoucí ze sníženého množství A $\beta$  v mozku. Agregace RTN3 a s ním spojené dystrofické neurity se přitom objevují také u pacientů s AD i u intaktních myši ve věku 2 let, přičemž jejich přítomnost koreluje s kognitivním úpadkem (Shi a kol., 2009b). Yokota a kol. (2006) naopak zjistili celkově sníženou expresi RTN3 ve spánkových lalocích pacientů s AD.

Zdá se tedy, že retikulonové proteiny tvoří nedílnou součást patologie AD, kde hrají roli jak protektivní (potlačování tvorby A $\beta$ ), tak i negativní (při agregaci vyvolané nadměrnou expresí), a RTN3 představuje jeden z možných terapeutických cílů při léčbě této choroby.

Velmi důležitou, ale na výše popsaných mechanismech asi zcela nezávislou, roli zde hraje i receptor NgR1 (Park a Strittmatter, 2007). Je známo, že NgR1 (a podobně i NgR2 a NgR3, Zhou a kol., 2011) může přímo vázat APP i samotný A $\beta$ , blokuje tvorbu A $\beta$  a chrání před jeho akumulací (Park a kol., 2006a, b, Park a Strittmatter, 2007). Předpokládá se, že mechanismem může být ochrana takto vázaného APP před působením BACE1, tudíž by tento mechanismus nijak nesoúvisel s Nogo proteiny. Delece genu pro NgR1 na myším modelu vede ke zvýšenému hromadění A $\beta$ , jeho ukládání v placích a dystrofii neuronů (Park a kol., 2006a). Naopak lze průběh AD na myším modelu zmírnit podáním rozpustného fragmentu NgR1 (Park a kol., 2006a). Intracerebroventrikulární a dokonce i subkutánní podání solubilizovaného NgR1 (třebaže neprochází hematoencefalickou bariérou) sníží hladinu A $\beta$  v mozku a vede k jeho vyplavení do séra a zlepšení prostorové paměti (Park a kol., 2006b).

NgR2 váže APP s ještě vyšší afinitou než NgR1 (Zhou a kol., 2011). Jeho delece ovšem působí zcela opačně než v případě NgR1 – v tomto případě se akumulace A $\beta$  delecí sníží, místo aby se zvýšila. Předpokládaným mechanismem je v tomto případě změna v transportu APP na povrch buněk (Zhou a kol., 2011).

V mozcích pacientů zemřelých na AD je pozorovatelná změněná distribuce Nogo-A a NgR1. V pyramidových buňkách hipokampu a neokortexu je pozorovatelná nadměrná exprese proteinu Nogo-A (Gil a kol., 2006). Nogo-A se zde ve zvýšené míře objevuje v tělech neuronů. NgR1 se přesouvá do neuropilu, zatímco u zdravých osob je převážně

v perikaryotickém prostoru (Park a Strittmatter, 2007). Nogo-A (Gil a kol., 2006) i NgR1 (Park a kol., 2006a) se mohou akumulovat v amyloidních placích. (Přehled viz Pernet a Schwab, 2012, Prior a kol., 2010)

Maslah a kol. (2010) ukázali, že v myším modelu AD (exprese mutovaného APP) vede genová delece Nogo ke zmírnění kognitivního deficitu v rané a střední fázi onemocnění a ochraně synapsí. Odumírání neuronů, glióza a akumulace amyloidu naopak zůstávají nezměněny. Pozorovaný účinek zřejmě bezprostředně nesouvisí s výše popsáním působením retikulonů a NgR na tvorbu A $\beta$ , ale je spíše spojen s „klasickou“ cestou působení Nogo-A jako regulátoru synaptické plasticity a axonálního růstu. Je pravděpodobné, že zvýšená plasticita CNS umožňuje částečně kompenzovat ztráty neuronů v průběhu počáteční fáze onemocnění.

### **2.3.2. Role Nogo-A v kognitivních poruchách spojených se stárnutím**

Také u zvířecích a lidských jedinců bez jasných příznaků AD často dochází k poklesu kognitivních funkcí v průběhu stárnutí, který často postihuje hipokampálně závislé funkce (deklarativní paměť a učení, prostorová navigace). Příčinou deficitu je spíše ztráta konektivity a synaptické plasticity než přímý úbytek neuronů (Burke a Barnes, 2006), což lze demonstrovat na biochemické (VanGuilder a Freeman, 2011) i elektrofyziologické (Boric a kol., 2008, Tombaugh a kol., 2002) úrovni.

VanGuilder a kol. (2010, 2011, 2012) demonstrovali, že patologické, ale nikoli zdravé stárnutí je doprovázeno snížením exprese proteinů spojených se synaptickou plasticitou, a naopak se zvýšenou expresí inhibitorů této plasticity. Možným mechanismem kognitivní poruchy ve stáří by tedy byla nadměrná inhibice neuroplasticity. U stárnoucích potkanů lze na individuální úrovni vyzorovat jasnou negativní korelaci mezi kognitivními schopnostmi v Morrisově vodním bludišti (MWM), tedy hipokampálně závislé úloze (Morris a kol., 1982) a množstvím MAI (včetně Nogo-A) a jejich receptorů NgR1 a PirB v hipokampu (VanGuilder a kol., 2012, VanGuilder Starkey a kol., 2012). Existuje zde paralela s nadměrnou expresí Nogo-A pozorovanou v hipokampálních neuronech pacientů s AD (Gil a kol., 2006).



### 2.3.3. Nogo v amyotrofické laterální skleróze

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je fatální a nevyléčitelné neurodegenerativní poškození postihující motoneurony v míše, mozgovém kmeni i mozkové kůře. Je doprovázena slabostí a svalovou atrofií, vedoucí po několika letech od prvních projevů k úmrtí v důsledku ochabnutí dýchacích svalů. Část případů je spojena s mutacemi genu kódujícího superoxid dismutázu SOD1, což je enzym chránící buňku před oxidativním poškozením.

Na možný význam Nogo proteinů v patologii této choroby upozornili Dupuis a kol. (2002). Ukázali, že pacienti trpící ALS i transgenní myši v animálním modelu této choroby vykazují abnormálně zvýšenou expresi Nogo-B a ještě ve větší míře Nogo-A v kosterním svalu, kde je naopak potlačena exprese typicky svalové izoformy Nogo-C. Tyto změny jsou přitom odlišné od projevů denervace, která sice sníží expresi Nogo-C, ale množství Nogo-A neovlivní. Poměr Nogo-A ku Nogo-C v biopsiích kosterního svalu by tedy mohl sloužit jako citlivý diagnostický marker pro detekci ALS ještě před projevem prvních klinických příznaků (Dupuis a kol., 2002, Pradat a kol., 2007). Tuto možnost podporuje i práce Jokic a kol. (2005), která ukazuje souvislost mezi obsahem Nogo-A a B ve svalových biopsiích pacientů a závažností klinických projevů. Wojcik a kol. (2006) ovšem zjistili, že samotný výskyt Nogo-A ve svalech není jako marker dostačující, protože podobné zvýšení se objevuje i u jiných typů neuromuskulárních chorob. Také v míše byly v modelu ALS pozorovány signifikantně zvýšené hladiny Nogo-A i Nogo-C (Dupuis a kol., 2002). Dalším potenciálním markerem ALS je přítomnost solubilních fragmentů Nogo-A v mozkomíšním moku (Jurewicz a kol., 2007).

Jokic a kol. (2006) zjistili, že genetická delece Nogo-A omezila denervaci svalů a zvýšila dobu dožití u myšního modelu. Nadměrná exprese Nogo-A ve svalu by podle autorů mohla být odpovědná za zánik nervosvalových plotének a v důsledku toho i motorických axonů. Yang a kol. (2009) ovšem došli k závěrům zcela opačným. Podle jejich výsledků je role Nogo proteinů v ALS neuroprotektivní, kdy zvýšená exprese (u odlišného myšního modelu) prodlužuje dobu dožití a naopak. Delece Nogo-A a B vedla i v heterozygotním stavu k urychlení průběhu choroby, v homozygotním stavu byly potom následky ještě závažnější. Nesoulad s prací Jokic a kol. (2006) vysvětlují tím, že v případě selektivní delece Nogo-A dochází ke kompenzačnímu zvýšení exprese Nogo-B, které mohlo být v tomto případě natolik výrazné, že zcela zvrátilo fenotypový projev mutace.

#### 2.3.4. Nogo a jeho vazební partneři v dalších poruchách CNS

Roztroušená skleróza je demyelinizační autoimunitní onemocnění, způsobené vznikem T-lymfocytů útočících proti oligodendrocytům a myelinu, v pozdějších fázích se zapojují i mikroglie, makrofágy a další imunitní buňky. V postižené CNS dochází k zánětlivým procesům, vedoucím k demyelinizaci a následnému přerušení axonů, a tím pádem k nezvratnému funkčnímu poškození. Je zajímavé, že u pacientů se mohou přirozeně objevovat protilátky namířené proti Nogo-A (Reindl a kol., 2003), jejich význam ale není jasný a mohl by být protektivní (Yan a kol., 2006).

Myším modelem roztroušené sklerózy je experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE). V tomto modelu je hladina Nogo-A v akutní fázi nejprve snižena, v chronické naopak významně roste (Theotokis a kol., 2012). V EAE bylo demonstrováno, že potlačení exprese Nogo-A metodou malých interferujících RNA vedlo ke zmírnění symptomů a podpořilo regeneraci axonů a funkční zotavení (Yang a kol., 2010). K potlačení Nogo-A závislé signalizace v EAE byla použita také aktivní imunizace peptidy odvozenými z Nogo-A, pasivní imunizace podáním monoklonálních protilátek proti Nogo-A, a také (na myším modelu) úplná delece všech izoform Nogo. Všechny způsoby potlačení signalizace přes Nogo-A vedou ke zmírnění klinických projevů, demyelinizace a ztráty axonů, aniž by přitom došlo ke zhoršení zánětlivých procesů – ty byly naopak zmírněny (Fontoura a kol., 2004, Karnezis a kol., 2004, Yan a kol., 2006). Také zablokování LINGO-1 (jeden z koreceptorů NgR1) vede ke zlepšení příznaků v animálních modelech roztroušené sklerózy, kde podporuje diferenciaci oligodendrocytů a remyelinizaci (Mi a kol., 2007). V patologii roztroušené sklerózy by mohl hrát roli též další z ligandů NgR1, a to BLYS, který je u pacientů produkován aktivovanými astrocyty (Krumbholz a kol., 2005).

Signalizace přes Nogo-A se může uplatňovat i u Parkinsonovy choroby. Inoue a kol. (2007) zjistili zvýšenou expresi LINGO-1 (koreceptor NgR1) v *substantia nigra* u pacientů s Parkinsonovou chorobou i jejích animálních modelech. Genová delece nebo akutní blokáda LINGO-1 vedla ke zvýšenému přežívání neuronů.

Retikulony jsou také podezřívány z možné role v hereditární spastické paraplegii. Častou příčinou této choroby jsou mutace spastinu, proteinu, jehož vazebními partnery jsou právě retikulony (Mannan a kol., 2006).

Zvýšená exprese hipokampálního Nogo-A se projevuje u lidských pacientů s epileptickými ložisky ve spánkovém laloku, může se zde podílet na regulaci patologické neuroplasticity a předcházet degeneraci neuronů (Bandtlow a kol., 2004).

Yan a kol. (2006) navrhuji hypotézu, že retikulony mají primárně význam v intracelulárním transportu proteinů a fungování endoplasmatického retikula. Při narušení jejich funkce dochází k patologickým změnám v lokalizaci či expresi řady jiných proteinů, což může být společným podkladem různých neurodegenerativních poruch, jako je AD, ALS a jiné.

### **2.3.5. Nogo proteiny a jejich vazební partneři v mrtvici a jejich modelech**

Podpora neuroplasticity je velmi důležitá v terapii mozkové mrtvice. Celá řada prací ukázala, že blokáda Nogo-A či jeho receptorů vede ke zlepšenému funkčnímu zotavení po mrtvici.

V modelu mrtvice, vyvolané trvalou okluzí *arteria cerebri media* (MCAO), lze vyvolat kompenzační neuroplasticitu (zejména v kontralaterálních oblastech kortexu), vedoucí ke zlepšení motorických dovedností, akutní blokádou Nogo-A pomocí specifických protilátek (Markus a kol., 2005, Papadopoulos a kol., 2002, Seymour a kol., 2005, Tsai a kol., 2011, Wiessner a kol., 2003) či fragmentem NgR1 (Lee a kol., 2004). Akutní blokáda byla účinná také u fototrombotického modelu mrtvice (Lee a kol., 2004, Wiessner a kol., 2003). Po MCAO provedené u starých potkanů (18 měsíců) měla protilátka proti Nogo-A významný efekt i na zlepšení dlouhodobé paměti ve vodním bludišti v úloze zaměřené na dlouhodobou paměť (Gillani a kol., 2010). Tyto zákroky většinou neovlivnily velikost poškozené oblasti.

Wang a kol. (2010a) ukázali, že v jádrech talamu akutní blokáda NgR1 (podání peptidu NEP1-40) po MCAO jednak potlačí expresi Nogo-A v oligodendrocytech, jednak sníží poškození neuronů v podmínkách ischemie a podpoří axonální regeneraci. Také umlčení (knockdown) NgR1 metodou RNA interference zlepší axonální regeneraci a funkční zotavení po MCAO, i když neovlivní velikost infarktu.

Také genové delece byly v modelech mrtvice vyzkoušeny. Lee a kol. (2004) zjistili výrazné zlepšení motorických funkcí po fototrombotické lézi u potkanů s vyřazením Nogo-A a B, anebo delecí NgR1. Adelson a kol. (2012) zjistili menší rozsah infarktu a výraznější funkční zotavení u myši s delecí PirB po MCAO.

U jinak intaktních zvířat lze po mrtvici nebo mozkové ischemii pozorovat zvýšenou expresi Nogo-A, NgR1 a jejich efektoru Rho-A (Eslamboli a kol., 2006, Cheatwood a kol., 2008, Jiang a kol., 2009, Wang a kol., 2010a), největší nárůst Nogo-A je patrný v okolí poškozených axonů a dendritů (Wang a kol., 2007). V oblasti ischemické penumbry je zvýšena také exprese receptoru PirB (Gou a kol., 2013).

Otevřenou otázkou je role Nogo-A a jeho receptorů v akutní fázi ischemického poškození. Genová delece NgR1 velikost nekrotické oblasti neovlivní (Lee a kol., 2004), akutní blokáda NgR1 má při ischemii v talamu neuroprotektivní vliv (Wang a kol., 2010a), stejně jako genová delece PirB (Adelson a kol., 2012). Při dočasné ischemii s reperfuzí vykazuje Nogo-A – nebo přinejmenším specifický region jeho aminoterminální domény – neuroprotektivní působení (Guo a kol., 2013b). Tomu odpovídá i zjištění, že blokáda nebo genová delece Nogo-A během akutní fáze ischemického poškození zhoršuje odumírání neuronů i mortalitu modelových zvířat (Kilic a kol., 2010). Lee a kol. (2004) ovšem u myši s delecí Nogo-A i B nezaznamenali větší poškození mozku po permanentní MCAO – byl zde naopak trend ke zmenšení velikosti infarktu. Je možné, že tento rozdíl byl způsoben odlišnostmi v modelu ischemického poškození (např. přítomností reperfuze) anebo charakterem genové delece.

### **2.3.6. Nogo a NgR1 ve schizofrenii**

Vedle neurodegenerativních chorob hrají Nogo proteiny roli také v neuropsychiatrických onemocněních, jakými jsou schizofrenie nebo bipolární porucha. V této kapitole budou shrnuta zjištění u lidských pacientů. Animální modely budou samostatně diskutovány níže, jednak proto, že se bezprostředně vztahují k tématu této práce, jednak proto, že mezi schizofrenií a jejími animálními modely existuje velmi obtížně překonatelná propast.

Schizofrenie je závažné onemocnění, postihující asi 1 % populace. Nejčastěji propuká v rané dospělosti, průběh je ale dost variabilní, může docházet k remisím s opětovnými relapsy, úplnému či částečnému uzdravení anebo progresivnímu zhoršování stavu. Klinické symptomy schizofrenie dělíme na pozitivní (agitovanost, halucinace, bludy, poruchy formálního myšlení), negativní (citová oploštělost, abulie, anhedonie a sociální stažení) a kognitivní (zhoršené zpracování informací, poruchy pozornosti, myšlení, učení a paměti, dezorientace, zhoršení exekutivních funkcí). V důsledku toho tato choroba velmi těžce postihuje kvalitu života pacientů i jejich společenské uplatnění.

Schizofrenie je považována za neurovývojovou poruchu (Goldman-Rakic, 1995, Lewis a Levitt, 2002), ovlivňovanou celou řadou rizikových faktorů pre- i postnatálně, s předpokládaným vlivem genetické zátěže. Vedle klinicky patrných projevů je doprovázena také funkčními, morfologickými a neurochemickými změnami v mozku. U pacientů je pozorován úbytek bílé hmoty mozkové, abnormality v myelinizaci

a početnosti i funkci oligodendrocytů (Davis a kol. 2003, Takahashi a kol., 2011). Ty by se mohly podílet na abnormální konektivité neuronálních sítí a zhoršené komunikaci mezi jednotlivými částmi mozku, včetně narušeného zapojení prefrontální kůry, které je pro toto onemocnění typické (Bunney a Bunney, 2000, Haroutunian a Davis, 2007). Souvislosti nasvědčuje i to, že poslední stádium myelinizace v prefrontální kůře probíhá v období časně dospělosti, kdy se často objevují i první projevy schizofrenie. Na propojení mezi geny asociovanými s oligodendrocyty či myelinem a pravděpodobností vzniku schizofrenie ukazují také genetické asociační studie. Vedle změn v konkrétních genech však může být důležitá i posttranskripční regulace exprese proteinových produktů, zprostředkovaná systémem miRNA (Beveridge a Cairns, 2012). Přehled prací týkajících se abnormalit bílé hmoty a myelinu ve schizofrenii podávají Willi a Schwab (2013).

Novak a kol. (2002) popsali u schizofrenních pacientů zvýšenou expresi Nogo mRNA (izoformy nerozlišeny). Následná práce na jiném vzorku pacientů (Novak a Tallerico, 2006) ukázala nadměrnou expresi transkriptu Nogo-C v mozcích schizofreniků a naopak sníženou expresi Nogo-B v prefrontální kůře pacientů s depresí, zatímco u bipolární poruchy nebyla nalezena žádná změna. V mozcích schizofreniků byl nalezeno i mírné snížení exprese NgR1 na úrovni transkriptu (Hsu a kol., 2007).

Gen *nogo* je umístěn na chromozomálním lokusu 2p13–14 (Yang a kol., 2000), který je v některých genomových studiích asociován se schizofrenií (Coon a kol., 1998, Shaw a kol., 1998, Straub a kol., 2002). V nepřepisované oblasti (3'-UTR) genu *nogo* je lokalizován polymorfismus spojený s insercemi CAA a TATC (Novak a kol., 2002). Inserce v tomto místě korelují s výrazně zvýšenou expresí transkriptu (Novak a Tallerico, 2006). Výskyt homozygotů pro tento polymorfismus je přitom vyšší mezi schizofreniky než u zdravé populace (Novak a kol., 2002). Tan a kol. (2005) potvrdili zvýšené riziko schizofrenie spojené s tímto polymorfismem, ovšem pouze u osob ženského pohlaví. Řada dalších studií ovšem spojení tohoto polymorfismu se schizofrenií nepotvrdila (Covault a kol., 2004, Gregorio a kol., 2005, Chen a kol., 2004, Xiong a kol., 2005). Byly také nalezeny asociace dvou polymorfismů v jediném nukleotidu (SNP) genu *nogo* se schizofrenií (Jitoku a kol., 2011).

Gen pro NgR1 leží na chromozomálním lokusu 22q11.2 (Hsu a kol., 2007), jehož mikrolece jsou asociovány se závažnými duševními poruchami, které zahrnují poruchy pracovní paměti, pozornosti a exekutivních funkcí (včetně zvládání konfliktu mezi různými skupinami stimulů, Bish a kol., 2005), narušený sensorimotorický gating, emoční problémy

(anxieta, deprese, sociální stažení) a obsedantně-kompulzivní chování. Doprovází je anatomické změny, jako je zmenšený objem mozku, zvětšení mozkových komor a abnormality bílé hmoty (přehled viz Borrie a kol., 2012, Hsu a kol., 2007). Mikrodelece v tomto lokusu zvyšují riziko rozvoje schizofrenie, a jsou zodpovědné asi za 2 % případů tohoto onemocnění (Karayiorgou a kol., 1995, Liu a kol., 2002). To, že gen NgR1 leží v tomto lokusu a jeho produkt je důležitý pro neuroplasticitu, správný vývoj CNS a myelinových pochev, vede k hypotéze, že právě NgR1 by mohl s rozvojem schizofrenie souviset.

Závěry studií hledajících korelace mezi polymorfismy genu pro NgR1 a schizofrenií se různí. Některé práce našly slabé, leč signifikantní spojení mezi jeho polymorfismy a rizikem propuknutí schizofrenie (Hsu a kol., 2007, Liu a kol., 2002, a Budel a kol., 2008 – zde ale jen u jednoho ze tří zkoumaných populačních vzorků), jiné nikoli (Meng a kol., 2007, Pasaje a kol., 2011). Vliv zde zřejmě hraje i pohlaví zkoumaných osob (Fallin a kol., 2006, Hsu a kol., 2007). U pacientů se schizofrenií bývají nalézány vzácné alely NgR1, které se u zdravých osob nevyskytují (Budel a kol., 2008, Hsu a kol., 2007, Sinibaldi a kol., 2004), a bylo ukázáno, že tyto mutace ovlivňují různé aspekty fungování NgR1, a omezují jeho schopnost potlačovat axonální růst na myelinovém substrátu (Budel a kol., 2008).

Je zajímavé, že asociace se schizofrenií byly nalezeny také u dalšího MAI, proteinu MAG. Také popsané spojení mezi schizofrenií a komplexem MHCI může být v této souvislosti relevantní, protože MHCI je stejně jako MAI vazebným partnerem receptoru PirB (přehled viz Willi a Schwab, 2013).

Poznatky osvětlující roli oligodendrocytů a exprese proteinů spojených s myelinem, včetně Nogo a jeho receptorů, v patogenezi schizofrenie pocházejí především ze dvou zdrojů – jednak z *post mortem* studií mozků pacientů, jednak z genetických asociačních studií. Studie zaměřené na genetiku schizofrenie ovšem narážejí na malou replikovatelnost zjištěných asociací (Voineskos a kol., 2009) a velké množství často velmi různorodých genů, které jsou se schizofrenií spojeny (Willi a Schwab, 2013). Není to ale překvapivé, vzhledem k tomu, že schizofrenie je podle všeho onemocněním heterogenním a multifaktoriálně podmíněným. Jakákoli vysvětlení založená pouze na genetickém pohledu tedy musejí být nutně neúplná. To jistě platí i o spojení mezi Nogo a NgR1 se schizofrenií – mutace v těchto genech jsou přímou příčinou schizofrenie jen u velmi malého procenta pacientů, anebo jsou jen jednou z mnoha možných dílčích příčin.

## 2.4. Chování a kognitivní funkce v animálních modelech s narušením Nogo-A dependentní signalizace

Protein Nogo-A a jeho receptory byly zpočátku studovány v animálních modelech především z hlediska neurovývojového, a jako inhibitory regenerace po zranění CNS. Jejich potenciální vliv na chování a kognitivní funkce byl proto v řadě prací zcela či z větší části opomíjen. Tato situace se změnila, teprve když byl demonstrován význam Nogo-A a jeho receptorů pro synaptickou plasticitu, a objevily se důkazy spojující tyto proteiny s neuropsychiatrickými onemocněními. Důraz se v pozdějších studiích klade na úlohy testující učení a paměť (u nichž se předpokládá význam synaptické plasticity) a dále na zvířecí chování obdobné symptomům akutní schizofrenie u člověka (tzv. schizofrenii podobné chování), popřípadě schizofrenii příbuzné endofenotypy (rysy chování související se schizofrenií, ale nezávislé na přítomnosti akutní psychotické ataky).

### 2.4.1. Úvod k animálním modelům schizofrenie

Animální modely psychiatrických onemocnění jsou problematickou a poněkud kontroverzní oblastí. Příslušná onemocnění jako taková jsou ryze lidským fenoménem, a u zvířat je tedy nelze vyvolat, nýbrž pouze napodobit. Rozhodující je potom míra validity takového modelu (Lipska a Weinberger, 2000).

**Fenomenologická validita** udává, nakolik se příznaky vyvolané u laboratorních zvířat shodují s těmi, které jsou pozorovány u lidských pacientů v klinické praxi. Již na této nejzákladnější úrovni dochází k mnoha problémům, spojeným zejména s absencí řeči u zvířat a tedy nemožností nahlédnout do jejich subjektivního prožívání. Objektivně pozorovatelné ukazatele totiž často nebývají pro dané onemocnění dostatečně specifické. Jednoznačné závěry často komplikuje i rozmanitost projevů u lidských pacientů, kdy jsou různé symptomy manifestovány v různé míře nebo mohou chybět zcela, což opět ztěžuje srovnání s animálním modelem.

**Konstrukční validita** udává, do jaké míry odráží model etiopatogenezi (komplex příčin vzniku a mechanismů rozvoje) choroby u člověka. U psychiatrických onemocnění je často obtížně posuzovatelná, protože jejich příčiny zpravidla neznáme. Modely určitého onemocnění proto mohou být čistě symptomatické, anebo vycházet z různých hypotéz o jeho původu a napomáhat jejich testování, hovořit o konstrukční validitě v pravém slova smyslu však lze jen výjimečně.

Konečně **prediktivní validita** hodnotí citlivost příznaků na léky ovlivňující průběh modelované choroby, zde např. antipsychotika. Je velmi důležitá pro praktickou aplikaci modelu při hledání nových léčiv. Její hodnocení je nicméně problematické v případě chorob, pro něž je v humánní medicíně k dispozici jen symptomatická nebo paliativní léčba.

Schizofrenie u člověka se projevuje třemi základními skupinami symptomů. K pozitivním symptomům řadíme celkovou agitovanost, přítomnost halucinací, bludů a poruch formálního myšlení, k negativním symptomům citovou oploštělost, ztrátu vůle, anhedonii a sociální stažení, samostatnou skupinu představují kognitivní symptomy, zahrnující poruchy myšlení, učení a paměti.

V animálních modelech schizofrenie je jedním ze základních projevů narušený sensorimotorický gating (narušení prepulsní inhibice úlekové reakce). Tento projev je pro schizofrenii charakteristický, ne však zcela specifický, protože se objevuje i u jiných neuropsychiatrických onemocnění. Dále se hodnotí hyperaktivita nebo hyperlokomoce a stereotypní chování jako obdoba pozitivních symptomů u člověka. Vyhýbání se sociálním kontaktům je negativní symptom, který se projevuje podobně u lidí i zvířat. Perseverace (ztráta kognitivní flexibility), poruchy asociativního učení a pozornosti (snížená latentní inhibice) a jiné kognitivní deficity odrážejí kognitivní symptomy. Často je posuzována také reakce na farmaka, například podání dopaminových agonistů (amfetamin) by mělo u modelu schizofrenie symptomy vyostřit, podobně jako podání antagonistů NMDA receptorů (dizocilpin, fencyklidin).

Genetické modely schizofrenie, kam lze práce zaměřené na delece, mutace a kvantitativní změny exprese genů Nogo-A a NgR1 počítat, představují slibný přístup k modelování schizofrenie, mají nicméně svá omezení. Schizofrenie u člověka je komplexní onemocnění, s příspěvkem většího množství genetických i environmentálních faktorů. Je co do původu patrně heterogenní a navíc značně variabilní ve svém projevu. Mutace v genech kódujících proteiny Nogo a NgR1 se objevují jen u malého procenta schizofreniků, nemůže tedy jít o model univerzálně platný (Willi a Schwab, 2013). Je ovšem možné, že větší část případů schizofrenie je zapříčiněna dysregulací systému miRNA, který ovládá expresi celé řady genů (Beveridge a Cairns, 2012, Forstner a kol., 2013, Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011, Xu a kol., 2012, přehled viz Willi a Schwab, 2013). Do tohoto vzájemně provázaného systému zřejmě zapadají i proteiny NgR1 a Nogo.



Podrobnější přehled k animálním modelům schizofrenie viz Bubenikova-Valesova a kol. (2008a), Jones a kol. (2011), Willi a Schwab (2013).

#### **2.4.2. Transgenní modely zaměřené na Nogo-A**

Řada prací zabývajících se zvířaty s delecí Nogo-A nepopisuje žádné nebo téměř žádné behaviorální projevy. Mnohdy je to ovšem proto, že byly provedeny jen základní nebo dokonce žádné behaviorální testy, proto podobné práce mají jen malou výpovědní hodnotu. Chování a kognice začala být věnována zvýšená pozornost teprve v nedávné době, v souvislosti s navrženým spojením mezi Nogo-A a duševními poruchami.

Marklund a kol. (2009) neuvádějí motorické, anatomické ani behaviorální změny u dvojité delecce Nogo-A a B, bohužel chování nebylo cíleně studováno. Podobně tomu bylo v práci Cafferty a kol. (2010) s delecí Nogo, MAG a OMgp. Kim a kol. (2003b) zaznamenali z behaviorálních projevů pouze nesignifikantně zvýšenou thigmotaxi myši s delecí Nogo-A v otevřeném poli. Lee a kol. (2010) ovšem našli v tomtéž testu na podobném modelu významné změny v lokomoční aktivitě. Nezměněné kognitivní schopnosti v Morrisově vodním bludišti (MWM) po delecí všech tří izoforem proteinu Nogo našli Masliah a kol. (2010).

Simonen a kol. (2003) při prvotní charakterizaci myši s delecí Nogo-A (bez zvláštního důrazu na chování) rovněž nezaznamenali žádné behaviorální změny. Později však byly u myši s totožným typem genové manipulace (byť s odlišným genovým pozadím) nalezeny významné behaviorální anomálie.

Willi a kol. (2009) na tomto modelu provedli podrobnější behaviorální testování, jaké do té doby u zvířat s delecí Nogo-A chybělo. Zjistili normální citlivost k bolesti, nenarušenou úlekovou reakci na zvukový stimul, neovlivněné strachové podmiňování, nezměněné projevy explorační a anxiety ve zvýšeném křížovém bludišti a rovněž normální učení v neprostorové úloze aktivního vyhýbání (*two-way active avoidance learning*) i prostorovém testu MWM. Zajímavé bylo zjištění lepší motorické koordinace na rotujícím válci (*Rotarod test*) u zvířat s delecí Nogo-A oproti kontrolám. Studována byla i cirkadiánní aktivita. Při běžném cyklu 12 hodin světla a 12 hodin tmy jevila transgenní zvířata normální rytmicitu chování, nicméně vykazovala výraznou hyperaktivitu během tmavé fáze dne, nikoli však za světla. Hyperlokomoce po podání amfetaminu byla také u zvířat s delecí Nogo-A dramatictější než u kontrol, což ukazovalo na změny v neuropřenaševých systémech.

Navazující studie Willi a kol. (2010) pokračovala ve zkoumání stejného modelu a soustředila se cíleně na potenciální projevy podobné schizofrenii. Ve vyvýšeném křížovém bludišti a testu otevřeného pole nebyly nalezeny žádné změny v chování, což souhlasí s dřívějšími výsledky a ukazuje, že úzkost i explorace nového prostoru nejsou delecí Nogo-A ovlivněny. Navzdory zachovanému sluchu i normální úlekové reakci byla u transgenních myší snížena prepulsní inhibice úlekové reakce, což je důležitý symptom schizofrenii podobného chování. Snížená latentní inhibice ukazuje na zhoršené asociativní učení, a také behaviorální flexibilita hodnocená při přeučení (reversal) ve vodním T-bludišti byla zhoršena. Obě tato pozorování poukazují na přítomnost kognitivního deficitu. V sociálním chování nebyly žádné změny zaznamenány. Potvrzena byla hyperlokomoce vyvolaná amfetaminy. Detailněji byly hodnoceny změny v neuropřenašecových systémech, kde byly nalezeny abnormality v hladinách dopaminu a serotoninu (nikoli však GABA a glutamátu) a v expresi D2 receptorů. Tyto výsledky ukazují, že studované transgenní myši mohou být považovány za model schizofrenie, nebo alespoň některých jejích projevů.

Willi a kol. (2010) pro srovnání použili také akutní blokádu Nogo-A protilátkou, která nezměnila reaktivitu na amfetamin, ani expresi D2 receptorů. To ukazuje, že změny vznikající po delecí Nogo-A jsou spíše důsledkem narušeného vývoje CNS, než akutních změn v synaptické plasticitě. Za zmínku stojí, že ve starších studiích podání protilátky neovlivnilo ani pozdější učení v MWM (Lenzlinger a kol., 2005, Marklund a kol., 2007).

### **2.4.3. Transgenní modely zaměřené na receptory NgR1 a PirB**

Větší počet prací se věnoval myším s delecí genu pro NgR1. Už první z nich, Kim a kol. (2004), našla behaviorální abnormality, zejména sníženou lokomoci a zvýšenou thigmotaxi v testu otevřeného pole (snad odpovídající zvýšené anxietě), a motorické poškození při běhání na rotujícím válci (*Rotarod test*).

Hsu a kol. (2007) již cíleně testovali hypotézu, že mutace příslušného genu mohou mít podíl na vzniku schizofrenie. U nové linie myší se zablokovanou expresí NgR1 zaznamenali v testu otevřeného pole sníženou lokomoci a panáčkování, s nesignifikantním trendem ke zvýšené thigmotaxi (což odpovídá závěrům Kim a kol., 2004, získaným ale na jiném modelu), ale normální průběh habituace na nové prostředí (vývoj lokomoce v čase). Zajímavé je, že změny chování v otevřeném poli byly přítomny u homo- i heterozygotů pro knockout alelu. Preference tmavého prostředí (*light/dark test*) zůstala zachována. Prepulsní inhibice úlekové reakce (PPI) byla normální, dokonce u mutantních myší nesignifikantně vyšší, s menší mírou úlekové reakce (což odporuje hypotéze schizofrenii podobného chování).

Úloha zaměřená na depresivní chování (test zavěšení myši za ocas) neodhalila rozdíl mezi oběma skupinami, zcela normální byla i reakce na bolestivé podněty. Rozdíly se neobjevily ani v úlohách strachového podmiňování, také pracovní paměť hodnocená v úloze opožděné alternace ve vodním T-bludišti byla normální. U transgenních myší tedy byly nalezeny behaviorální abnormality, ne však takové, které by bylo možno interpretovat jako schizofrenii podobné chování. Snížená lokomoce nicméně nemusí spojení se schizofrenií zcela vylučovat, protože u pacientů s delecí chromozomálního lokusu 22q11.2 (lokus asociovaný se schizofrenií, obsahující mj. gen pro NgR1) bývají přítomny i motorické obtíže. Ke zodpovězení otázky, zda knockout nezvyšuje alespoň náchylnost ke schizofrenii podobnému chování, byla provedena další série testů s myšmi, které byly v raném věku vystaveny působení dizocilpinu (MK-801), což by mohlo vést ke schizofrenii podobným symptomům v dospělosti. Ani tato domněnka se nepotvrdila. PPI zůstala nezměněna, stejně jako spontánní alternace. U zvířat s aplikací MK-801 v kritickém věku se objevily změny lokomoce – u normálních myší byla zvýšena, zatímco u myší s knockoutem NgR1 se dále snížila. Zmíněné experimenty tedy neukázaly, že absence NgR1 vedla ke schizofrenii podobným projevům u myší, a autoři se přiklánějí k pohledu, že i u lidí je role mutací NgR1 ve schizofrenii jen dílčí. Poškození genu či změny v expresi proteinu by například mohly destabilizovat neurální obvody a tím usnadňovat, ne však přímo vyvolávat propuknutí duševní poruchy.

Práce Budel a kol. (2008) byla svým zaměřením velmi podobná předešlé, použila ovšem jinou transgenní linii (stejnou jako Kim a kol., 2004). U této linie se alespoň některé známky schizofrenii podobného chování (nebo endofenotypů) objevily. Asi nejzávažnějším zjištěním byl kognitivní deficit v úloze opožděné alternace v suchém T-bludišti. Mutantní myši si úlohu pomaleji osvojovaly a i později dělaly mnohem více chyb, což ukazuje na zhoršení pracovní paměti. Naopak dlouhodobá paměť, hodnocená ve vodním radiálním bludišti a úloze pasivního vyhýbání, byla zachována. Preference tmavého prostředí před světlým nasvědčovala také normální míře úzkosti. V PPI se na úrovni skupin neobjevil statisticky signifikantní rozdíl, ovšem významný počet myší z knockoutové linie vykazoval úplné chybění PPI, což ukazuje, že vyřazení NgR1 má na tento parametr vliv, který je ovšem modulován dalšími, individuálními faktory. Podle závěrů této práce delece NgR1 vede ke schizofrenii podobnému chování nebo alespoň některým jeho příznakům, neovlivňuje ovšem dopaminergní systém, jak by se u pravého modelu schizofrenie očekávalo.

Žádné motorické ani kognitivní (v MWM) dopady vyřazení NgR1 nezaznamenali Hånell a kol. (2010). Také Park a kol. (2006b) nenalezli zhoršení pracovní prostorové paměti ve vodním radiálním bludišti u myši s delecí NgR1.

Karlén a kol. (2009) se zaměřili na kognitivní funkce, a použili zcela nový model myši s inducibilním zvýšením exprese NgR1 v neuronech mozku. Myši s nadměrnou expresí NgR1 vykazovaly selektivní zhoršení velmi dlouhodobé paměti (testy v MWM s prodlevou 30 a 60 dnů po osvojení), ale žádné poškození běžné dlouhodobé paměti (prodleva 1 den či méně). Pokud byla do určité doby po osvojení úlohy (do 10 dnů) zvýšená exprese NgR1 vypnuta, poškození velmi dlouhodobé paměti se neobjevilo. Pozorována byla i nižší preference běhání v kolečku, která by mohla souviset se zhoršeným motorickým učením, nebo jinými behaviorálními změnami (např. snížená motivace).

Lazar a kol. (2011) použili myši model s uměle vyvolanou mutací NgR1 vedoucí k záměně aminokyseliny ve vazebném místě pro Nogo-A, což se podobá některým mutacím zaznamenaným u schizofreniků. Tento zákrok ovlivnil chování myši, souvislost se schizofrenií zde ale není jasná. Mutantní myši měly normální prepulsní inhibici úlekové reakce. V testu preference sociálního kontaktu preferovaly přítomnost jiné myši (zatímco kontrolní zvířata nikoli) a byly méně anxiózní, zdá se tedy, že mutace zmírnila úzkost vyvolanou přítomností neznámého jedince. Jako test prostorové kognice byla použita analogie Morrisova vodního bludiště, kde zvířata neplavou, ale brodí se v mělké vodě, a hledají únikový otvor namísto ostrůvku (*paddle pool*). Osvojení úlohy probíhalo u obou skupin stejně, při prostorovém přeučení ovšem kontrolní zvířata dělala výrazně více chyb. Autoři výsledek interpretují tak, že paměťová stopa pro původní polohu únikového otvoru byla u kontrolních zvířat silnější a pomaleji vyhasínala, nicméně možná jsou i jiná vysvětlení. Pozorované efekty nebyly obecně příliš silné, a jejich charakter nenasvědčuje tomu, že by šlo o schizofrenii podobné chování (kde by měly být změny spíše opačného rázu). To ale může být dáno charakterem použité mutace. Zejména v případě sociálních interakcí je navíc výpovědní hodnota myšího modelu poměrně malá, protože sociální chování myši je méně podobné lidskému než třeba u potkana.

Práce studující vliv NgR1 na synaptickou plasticitu jakožto korelát učení ukazují, že NgR1 tlumí vliv expozice novým zážitkům na morfologii neuronů. Delece NgR1 snižuje práh pro objevení plasticity dendritických trnů v důsledku zkušenosti a destabilizuje již existující paměťové stopy (Akbik a kol., 2013).

Zajímavé je, že i NgR2 je zapojen do regulace synaptické plasticity v hipokampu, kde reguluje morfologii dendritických trnů, a jeho delece má vliv na chování – neovlivňuje sice učení, paměť ani flexibilitu v Morrisově vodním bludišti ani senzomotorické schopnosti, vede ale ke sníženým projevům anxiety či depresi podobného chování v testech otevřeného pole, zavěšení myši za ocas a strachového podmiňování (Borrie a kol., 2014).

Receptor PirB je zatím z behaviorálního hlediska prozkoumán jen málo. Adelson a kol. (2012) popsali u myši s jeho delecí facilitované motorické učení. Podobné účinky měla v některých studiích delece Nogo-A (Willi a kol., 2009) a NgR1 (Akbik a kol., 2013), v práci Kim a kol. (2004) ovšem delece NgR1 motorické učení naopak zhoršila.

Ačkoli prací s vyřazením nebo jinou manipulací NgR1 byla publikována řada, pozorované projevy nejsou příliš konzistentní, a neodpovídají ani projevům u myši s delecí Nogo-A, ani očekávaným fenotypům u modelu schizofrenie. Významná je v tomto ohledu zejména absence jasných postiznění PPI. V případě Nogo-A nebyly symptomy schizofrenii podobného chování u řady existujících transgenních modelů vůbec zkoumány, s výjimkou studií Willi a kol. (2009, 2010), které silně nasvědčují tomu, že myši s delecí Nogo-A schizofrenii podobné chování opravdu vykazují. Tento pohled podporují i data z potkaního modelu.

Přehled výsledků získaných s transgeny Nogo-A a NgR1 s ohledem na potenciální schizofrenii podobné chování viz Borrie a kol. (2012), Voineskos a kol. (2009) a Willi a Schwab (2013).

#### **2.4.4. Transgenní potkani se sníženou expresí Nogo-A**

Odpověď na mnohé otázky obestírající inhibitory axonálního růstu by mohl přinést revoluční model, jímž jsou transgenní potkani se sníženou expresí (knockdown) Nogo-A. Právě tento model je ústředním tématem experimentální části této disertační 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 transgenů je podrobněji popsána v publikacích Tews a kol. (2010, 2013).

Do genomové DNA těchto zvířat byl vpraven genový konstrukt kódující miRNA, komplementární k mRNA pro Nogo-A protein, a snižující jeho expresi mechanismem RNA interference. Dochází k vazbě miRNA na mRNA pro Nogo-A, což jednak brání translaci této mRNA, jednak vede k jejich urychlené degradaci. Díky tomu se exprese proteinu výrazně sníží.

Transkripce insertu (zprostředkovaná RNA polymerázou typu II) je spouštěna promotorem CAG, který je aktivní především v neuronech. Transkript se skládá z intronické sekvence, obsahující miRNA, za níž následuje sekvence kódující mRNA pro zeleně svítící protein EGFP. Ten slouží jako reportérový gen – díky zelené fluorescenci lze identifikovat buňky, v nichž je transkript exprimován, exprese EGFP je navíc úměrná expresi miRNA a představuje tedy i kvantitativní signál.

Genový konstrukt byl vložen do oocytů potkanů outbredního kmene Sprague-Dawley. Z několika zakladatelských linií byla nakonec vybrána linie L2, u níž byla exprese EGFP nejvyšší, a zároveň mendelovsky dědičná.

Model transgenních potkanů je v mnoha aspektech výhodnější než myší model s úplnou delecí, v dalších je s ním komplementární. Použitý zásah by měl výrazně omezit expresi proteinu Nogo-A, ale zároveň by nemusel spustit silné kompenzační mechanismy patrné u zvířat, jimž byl příslušný gen odstraněn úplně. Navíc je poněkud bližší předpokládanému stavu u osob s mutací příslušného genu, kde je změněno množství nebo funkčnost Nogo-A, protein však v mozku nechybí zcela (Willi a Schwab, 2013), popřípadě situaci u pacientů léčených podáním protilátky proti Nogo-A.

Snížení exprese Nogo-A je u transgenních potkanů vázáno především na neurony, u jiných buněčných typů není obsah tohoto proteinu výrazně změněn. To na jednu stranu představuje zásadní rozdíl oproti modelům s úplnou delecí, na druhou stranu to umožňuje zkoumat právě význam neuronální exprese Nogo-A.

Potkani představují obecně mnohem lepší model kognitivních a sociálních aspektů chování než laboratorní myši (Tews a kol., 2013, Willi a Schwab, 2013). Mohou u nich být aplikovány zavedené metody studia chování, schopné odhalit i poměrně jemné deficity, které by u transgenních myši mohly zůstat nepovšimnuty, například mírné poškození kognitivních funkcí, poškození behaviorální flexibility (Wesierska a kol., 2005) nebo tzv. schizofrenii podobné chování (Stuchlik a kol., 2004). Také z hlediska sociálního chování je potkan lepším modelem člověka než myš. Dále jsou potkani pro své větší rozměry vhodnější pro elektrofyziologická měření nebo chirurgické zákroky.

Transgenní potkani byli v první řadě důkladně prozkoumáni po molekulárně-biologické stránce. Potvrdil se předpoklad, že insert by měl být nejvíce aktivní právě v neuronech. Exprese EGFP markeru byla pozorovatelná ve 48,8 % kortikálních neuronů a 72,8 % neuronů v hipokampu, chyběl ale v oligodendrocytech a hipokampálních interneuronech. V kortexu potkanů linie L2 bylo množství mRNA pro Nogo-A sníženo na 50 % oproti kontrolám, množství proteinů stanovené pomocí metody Western blot kleslo dokonce na 30 % kontroly. V hipokampu bylo množství proteinu sníženo na 70 % kontrolního stavu. Imunofluorescenční stanovení ukázalo pokles proteinu Nogo-A na 70 % v cingulu, na 40 % v motorické kůře a hipokampu a 60 % v mozečku. V průměru byla exprese Nogo-A v neuronech CNS snížena asi na 50 % obvyklého stavu. Důležitým závěrem je také absence kompenzačního zvýšení exprese Nogo-B (Tews a kol., 2013).

Po neurochemické stránce je zajímavá zvýšená hladina serotoninu, ale normální množství dopaminu, v prefrontální kůře (PFC). V dorsálním striatu a *nucleus accumbens* byly hladiny dopaminu a serotoninu nezměněny (Enkel a kol., 2014). Elektrofyzilogické studie ukázaly výraznou facilitaci LTP v hipokampu i motorické kůře, i zvýšení maximální dosažitelné síly synapse (Tews a kol., 2013). Velmi důležitým nálezem byl signifikantní deficit prepulsní inhibice úlekové reakce.

Po behaviorální stránce byli potkani linie L2 nerozlišitelní od kontrol v testu otevřeného pole a vyvýšeného křížového bludiště, což ukazuje na nezměněnou lokomoční aktivitu, normální explorativní chování a anxieta.

V testu rozpoznání nového objektu (*novel object recognition task*) a rozpoznání přemístěného objektu (*object relocation task*) L2 i kontrolní potkani zprvu zcela normálně explorovali prostředí i předložené objekty. Při testovacím sezení, kdy byl jeden z objektů vyměněn za jiný nebo přemístěn, však L2 potkani věnovali změněnému objektu mnohem menší pozornost, což je možno interpretovat jako zhoršení krátkodobé paměti (neschopnost identifikovat změnu).

Ve vodním T-bludišti se L2 potkani zcela normálně učili původní polohu únikového ramene (prostorová navigace a učení byly zachovány). Při přeučení (reversal), kdy byla úniková platforma umístěna v opačném rameni, se ovšem L2 potkani přizpůsobovali nové situaci déle a dělali více chyb (perseverovali), což ukazuje na sníženou behaviorální flexibilitu.

Velmi zajímavé byly výsledky sociálního testu. Při interakci s neznámým partnerem jevíli L2 potkani pokles času věnovaného sociální interakci, jenž se týkal především nonanogenitální explorační. Existoval u nich i trend k nižšímu počtu kontaktních chování

(vzájemné čištění, podlézání), a významně častěji ukončovali vzájemnou interakci (sociální stažení). Frekvence vlastního mytí (*self-grooming*, možná známka stereotypního chování) změněna nebyla (Tews a kol., 2013).

Aspekty motivace a vnímavosti k odměně studovali Enkel a kol. (2014). V úloze *limited access consumption task* měli potkani – buď krmení *ad libitum*, nebo potravně deprivovaní – na omezenou dobu přístup ke slazenému mléku. Ukázalo se, že v obou případech kontrolní i L2 potkani konzumovali podobné množství sladké tekutiny, jejich vnímavost ke sladkému coby odměně byla tedy normální. Slazené mléko bylo následně použito jako odměna v operantní úloze. Během předtréninku, kdy bylo stisknutí páky odměněno slazeným mlékem, odpovídali L2 potkani normálně. Následně byli trénováni v úloze samovolně stoupajících poměrů (*spontaneous progressive ratio task*, metodika zavedená v pracích Hodos, 1961, Hodos a Kalman, 1963). V této úloze dostává potkan stále stejnou odměnu, ale k jejímu získání musí vynaložit postupně rostoucí úsilí (počet stisknutí páky). Hodnotí se poměr úsilí/odměna, při němž potkan poprvé na delší dobu přestane odpovídat (*break point*), nejvyšší počet stisknutí, který je potkan v daném sezení schopen pro získání odměny vykonat (*highest completed ratio*), a čas od počátku sezení do prvního stisknutí páky. L2 potkani začínali mačkat páku teprve po delším čase, a pro získání odměny byli ochotni vynaložit menší úsilí než kontrolní jedinci. V podmínkách extinkce, tj. zcela bez odměny, se potkani se sníženou expresí Nogo-A přestávali pokoušet o mačkání páky výrazně dříve. Menší vytrvalost odpovídání v úloze samovolně stoupajících poměrů nejspíše není projevem nižší subjektivní hodnoty odměny a vyloučit lze i procedurální deficit, který by se projevil i v předtréninku. Spíše by mohlo jít o narušené hodnocení poměru mezi náklady a ziskem. Tomuto vysvětlení by mohly nahrávat změny v hladinách neuropřenašečů, kde normální hladina dopaminu odpovídá vnímavosti k odměně, ale zvýšený serotonin v PFC může snižovat míru motivace a hodnocení zisku (Enkel a kol., 2014). Změny v množství ostatních neurotransmiterů ale sledovány nebyly.

Celkově lze shrnout, že L2 potkani vykazovali normální explorační chování a míru anxiety. Jevili ovšem několik důležitých symptomů schizofrenii podobného chování. K pozitivním symptomům je možno zařadit narušený sensorimotorický gating. Evidentní byly i kognitivní příznaky (zhoršená krátkodobá paměť, snížená behaviorální flexibilita, perseverační tendence). Jasným negativním příznakem je sociální stažení. Anhedonie (typická pro modely schizofrenie, deprese nebo blokádu opioidního systému) chyběla, deficit v úloze samovolně stoupajících poměrů může být ovšem projevem ztráty vůle (abulie).



Zvýšená synaptická plasticita, která byla u potkanů zaznamenána, sice obvykle koreluje se zlepšením učení a paměti, zde tomu ale tak nebylo. Možným vysvětlením je, že dlouhodobé a výrazné zvýšení LTP vede k patologické nerovnováze na synapsích a kognitivnímu deficitu. Významným zjištěním je podobnost behaviorálních projevů mezi transgenním potkanem se snížením exprese neuronálního Nogo-A a transgenní myši s úplnou delecí příslušného genu. Rozdíly však existovaly na neurochemické úrovni, protože u myši byla sníženo množství dopaminu v dorzálním striatu a hladina serotoninu byla nezměněna.

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Cíle a hypotézy

Tato práce je věnována významu proteinu Nogo-A na behaviorální úrovni, a výsledkům získaným na novém modelu transgenních potkanů se sníženou expresí této molekuly.

Cílem této práce je důkladná behaviorální fenotypizace Nogo-A-deficientních potkanů a kontrolních zvířat, a to se zřetelem na prostorovou kognici v hipokampálně závislých úlohách, učení a paměť, kognitivní flexibilitu a koordinaci a také prvky schizofrenii podobného chování. K dalším cílům patří testování sensorimotorických dovedností a citlivosti k odměně.

Nejdůležitější experimenty shrnuté v příložených publikacích testují hypotézu, podle níž by kognitivní poškození u zvířat se sníženou expresí Nogo-A mělo charakterem odpovídat kognitivním symptomům u schizofrenie, což znamená, že behaviorální flexibilita (schopnost přizpůsobit chování změněným podmínkám) a kognitivní koordinace (schopnost odlišit relevantní informace nebo vzpomínky od irrelevantních) by měly být narušeny 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 sensorimotorické schopnosti.

V experimentální části práce jsou zahrnuty toliko experimenty, na jejichž realizaci jsem měl hlavní podíl. V rámci projektu byly ovšem provedeny a do publikací zahrnuty i další experimenty, zejména biochemická a neurochemická stanovení a testy cirkadiánní rytmicity, na nichž jsem se podílel pouze nepřímo, a které jsem proto do experimentální části nezahrnul, ovšem budou diskutovány v závěrečné části.

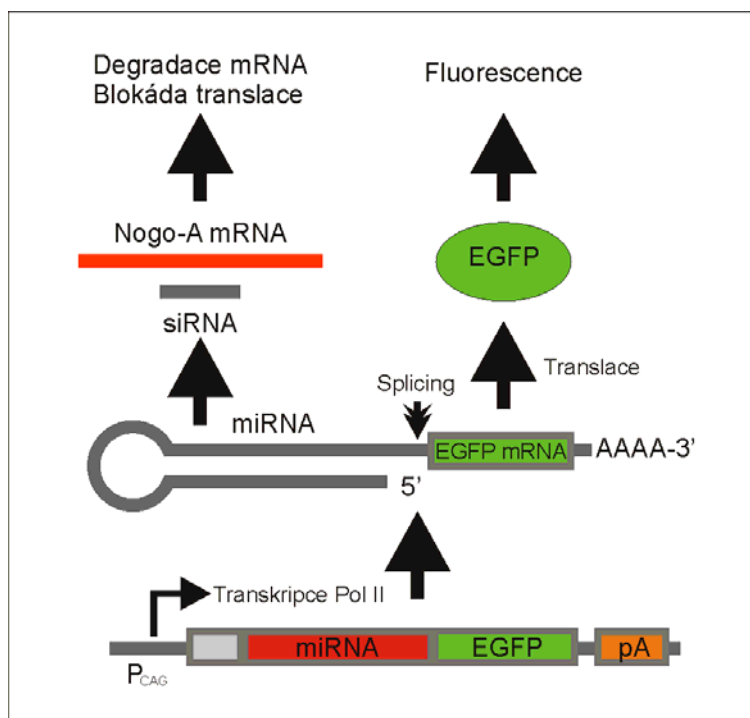
## 3.2. Metody

### 3.2.1. Transgenní model

Transgenní potkani se sníženou expresí Nogo-A (viz také kapitola 2.4.4.) 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 popsanych experimentech pocházeli z linie 2, plné označení SD-Tg(CAG-RNAi:Nogo-A,EGFP)L2ZI, zkráceně L2.

Potlačení exprese cílového proteinu bylo dosaženo pomocí inserce genového konstruktu exprimujícího miRNA, jež je dále zpracovávána na malou interferující RNA (siRNA) zaměřenou na exon 3 genu RTN4, specifický pro transkript Nogo-A. Vysokoafinní vazba mezi siRNA a mRNA pro Nogo-A blokuje translaci. Součástí insertu byl také reportérový gen, kódující zelený fluorescenční protein EGFP (viz obr. 4). Připravený konstrukt byl v podobě DNA vpraven pomocí mikroinjekce do jader oplodněných potkaních oocytů.

Blokáda exprese Nogo-A není v tomto modelu úplná. Hladiny neuronální exprese Nogo-A byly v průměru sníženy přibližně na polovinu, jmenovitě na 30 % v kortexu, 70 % v hipokampu a 60 % v mozečku. Expese v oligodendrocytech byla ovlivněna relativně málo (Tews a kol., 2013). Snížení exprese Nogo-A bylo nezávisle ověřeno i u zvířat použitých v této disertační práci (Petrásek a kol., 2014a, 2014b).



**Obr. 4 Transgenní konstrukt**

Schéma struktury DNA insertu vloženého do genomu potkanů linie L2, exprimované RNA a jejího zpracování na siRNA a mRNA pro EGFP marker.

(Podle Tews a kol., 2013)

### 3.2.2. Zvířata

V experimentech byli použiti dospělí potkaní samci linie L2 z chovu Central Institute of Mental Health, jako kontroly sloužili nepříbuzní, geneticky intaktní (*wildtype*) samci kmene Sprague-Dawley. V behaviorálních experimentech byli použiti potkani ve věku 3 – 8 měsíců (hmotnost 450 – 750 g).

Po převozu byla zajištěna náležitá přivykací doba (1 měsíc) před zahájením experimentů. Všechna zvířata byla přivykána na manipulaci experimentátory po dobu nejméně 1 týdne.

Potkani byli ubytováni ve standardních boxech (30×40×30 cm), ve standardních podmínkách v klimatizovaném zvěřinci (cyklus světlo/tma 12/12, teplota 21 °C, vlhkost 40 %). Behaviorální experimenty byly prováděny během světelné části dne. Zvířata měla volný přístup ke krmení a vodě, s výjimkou testování v segregáční baterii v kolotočovém bludišti, kdy byla po dobu experimentu potravně deprivována a udržována na 85 % normální váhy.

Všechny experimenty byly prováděny v souladu se zákonem na ochranu zvířat a mezinárodními směnicemi (86/609/EEC a 2010/63/EC). Experimenty byly schváleny komisí Fyziologického ústavu AV ČR pro ochranu zvířat.

První skupina zvířat (n = 20; 10 L2 a 10 kontrol) byla použita v experimentech segregáční baterie v kolotočovém bludišti a *delayed-matching-to-place* v Morrisově vodním bludišti (viz tab. 1).

Druhá skupina zvířat (n = 18; 9 L2 a 9 kontrol) byla použita v úloze aktivního alotetického vyhýbání se místu (AAPA) v kolotočovém bludišti, testech pasivního vyhýbání, chůze po laťce a neofobie/anhedonie, a experimentech zaměřených na cirkadiánní rytmicitu (viz tab. 2). Někteří zvířata během testování uhynula z příčin nesouvisejících s experimentem.

**Tab. 1 Časový rozvrh experimentů s první skupinou zvířat**

Věk (měsíce)	3 - 4	4	4,2	4,5	4,7	4,9	5,2			
Úloha	Privykání a handling	Kolotočové bludiště, segregací baterie						Morrisovo vodní bludiště		
		Habituační, sběr pelet	Stupeň 1	Stupeň 2	Stupeň 3	Stupeň 4	Stupeň 5	Viditelný ostrůvek	DMP	
Počet sezení		5	3	3	3	3	3	2	8	

**Tab. 2 Časový rozvrh experimentů s druhou skupinou zvířat**

Věk (měsíce)	3 - 5	5,3	5,5	5,7	5,9	6,1	6,3	6,5	6,7	6,9	7,1	7,3	7,5	7,7	7,9	7,9
Úloha	Privykání a handling	Kolotočové bludiště				Step-through			Chůze po laťce	Neofobie, anhedonie	Privykací perioda v testovacích prostorách	Cirkadiální rytmicita				
		Habituační	Akvizice	Retriev	Reverzal	Habituační	Akvizice	Test				12/12 LD cyklus	Trvalá tma			
Počet sezení		5	5	1	5	2	1	1	1	2		29	16			

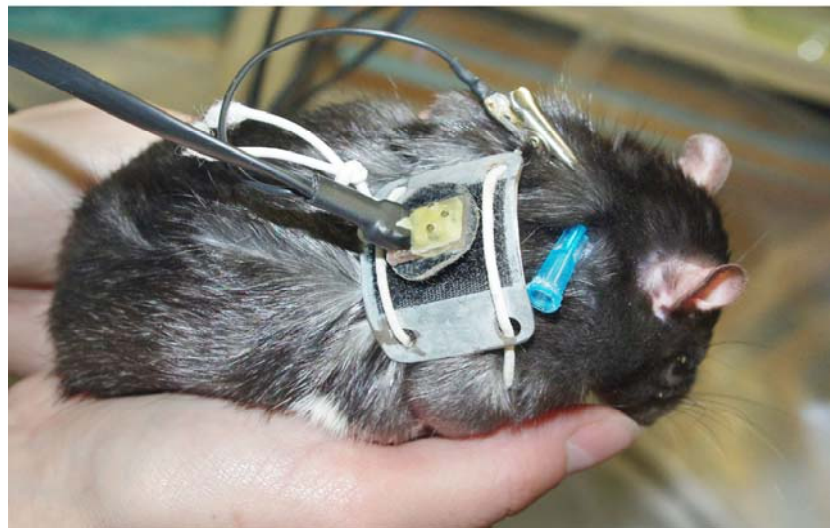
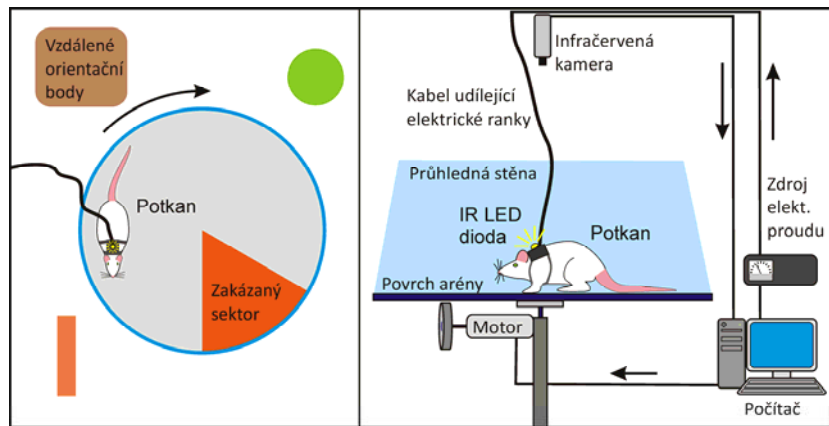
### 3.2.3. Kolotočové bludiště

Kolotočové bludiště má podobu kruhové kovové arény o průměru 82 cm s vyvýšeným okrajem, obehnané 30 cm vysokou stěnou z plexiskla (obr. 5). Arénka je umístěna v místnosti s množstvím vzdálených orientačních bodů.

Základní úlohou v kolotočovém bludišti je vyhýbání se místu. Při ní je v aréně počítačovým sledovacím systémem definován zakázaný sektor ve tvaru kruhové výseče o rozsahu 60°. Zakázaný sektor je v různých uspořádáních definován buď v referenčním rámci arény, nebo místnosti, popř. v obou rámcích. Vstup do tohoto sektoru je trestán mírnou elektrickou rankou, jejíž intenzita je u každého jedince volena individuálně tak, aby sice vyvolávala únikovou reakci, nebyla však nadměrně stresující, což by mohlo vést ke ztuhnutí (*freezing*), které je v rámci úlohy nežádoucí. Zde použita intenzita elektrického proudu se pohybovala mezi 0,4 a 0,7 mA (50 Hz). Elektrický šok trval 0,5 s, a pokud nevedl k opuštění zakázaného sektoru, byl opakován každých 1,5 s.

Potkani měli během experimentu na hřbetě upevněn postroj sloužící k upevnění kabelu, přivádějícího elektrický proud pro účely trestání (viz obr. 5). Elektrický proud byl pomocí svorky veden k jehle implantované do kožního záhybu na hřbetě potkana. Vlastní elektrický stimul byl zvířaty ovšem pociťován v místě kontaktu mezi tlapkami a uzeměnou podlahou arény, kde vzniká největší rozdíl napětí. Implantace ani přítomnost jehly není pro potkana bolestivá, po skončení experimentu byly navíc jehly šetrně odstraněny. Součástí postroje byla i infračervená LED-dioda sloužící jako indikátor polohy.

Sledování pohybu zvířat a arény i udílení elektrického trestu bylo zajišťováno počítačovým sledovacím programem (Tracker, Biosignal Group, USA).



**Obr. 5 Kolotočové bludiště**

Nahoře: Schématické znázornění aparatury.

Uprostřed: Potkan v kolotočovém bludišti a detail implantované jehly. Jehla prochází skrz záhyb volné kůže na hřbetě potkana a na konci je zatočená tak, aby nemohla vypadnout. Přítomnost jehly ani její aplikace není pro potkana bolestivá.

Dole: Potkan s nasazeným postrojem s LED-diodami (pro účely sledovacího programu). Postroj také slouží k upevnění kabelu, který napájí diodu a je zdrojem proudu pro udílení elektrické ranky. V tom případě proud prochází přes svorku, implantovanou jehlu a tělo potkana do uzeměné podlahy, je však zvířetem pociťován jen v místě kontaktu tlapky s kovem.

(Foto i schéma © Tomáš Petrásek)

Úloha vyhýbání se místu může být modifikována tak, aby zvířata měla k dispozici různé zdroje prostorových informací, například zhasínáním a rozsvěcením světel (skrytí či odkrytí vzdálených orientačních bodů), zaplavením arény mělkou vodou (skrytí pachových značek na povrchu arény) či jejím roztočením (disociace prostorových rámců arény a místnosti).

Vyhýbání se místu může být buď pasivní (sektor je definován vzhledem k povrchu arény, ať už tato rotuje či nikoli, potkan se tedy může vstupu do sektoru „vyhnout“ pasivně, tj. tím, že se nebude pohybovat) anebo aktivní (sektor je definován vzhledem k místnosti, avšak 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 (použitelná k určení polohy sektoru), zatímco jiná jsou irelevantní, zavádějící. Zvíře v tomto případě musí prostorové rámce odlišit a posoudit jejich užitečnost.

Všechny úlohy vyhýbání se místu na kolotočovém bludišti kladou nároky na sensorimotorické funkce, prostorovou navigaci a paměť. Aktivní vyhýbání se místu na rotující aréně je obzvláště kognitivně náročná úloha (Wesierska a kol., 2005), vyžadující kromě sensorimotorických funkcí a prostorové paměti také rozlišení značek umístěných v rotujícím referenčním rámci arény od orientačních bodů ve stabilním rámci místnosti, a vytvoření dvou různých, paralelních reprezentací, které jsou ve vzájemném konfliktu, protože jedna rotuje spolu s arénkou, druhá zůstává stabilní – tzv. *segregaci prostorových rámců*. Schopnost tyto reprezentace paralelně uchovávat a přepínat mezi nimi podle potřeby je označována jako *kognitivní koordinace* nebo *kognitivní kontrola* (Kubik a Fenton, 2005, Lee a kol., 2012, Wesierska a kol., 2005).

Přeučení (reversal) v úloze aktivního vyhýbání se místu je obecně považováno za ještě náročnější. Schopnost zaznamenat změnu pravidel a odlišit původně naučenou, nyní irrelevantní polohu sektoru od nové a aktuální, se někdy označuje jako *mnemonická segregace*, a dále zvyšuje kognitivní nároky, protože musí být aplikována současně se segregací prostorových rámců. Předpokládá se, že oba tyto procesy vyžadují funkci separace vzorců (*pattern separation*), závislou na hipokampu (Abdel Baki a kol., 2009, Burghardt a kol., 2012).

### 3.2.3.1. Segregační baterie v kolotočovém bludišti

Tento pokus byl navržen k prvotnímu otestování různých aspektů prostorového chování, a zvířata v něm prošla pěti stupni s odlišujícími se nároky na kognitivní funkce, zejména zpracování referenčních rámců arény a místnosti. Testováno bylo 20 potkanů ve věku 3 – 4 měsíců (Petrásek a kol., 2014a).

Design experimentu (viz tab. 3) byl navržen na základě starších prací (Abdel Baki a kol., 2009, Burghardt a kol., 2012, Wesierska a kol., 2005).

Potkani byli během experimentu potravně deprivováni, a kromě vyhýbání se zakázanému sektoru na aréně také sbírali čokoládové kuličky (Nesquik, Nestlé Czech Republic) vypadávající průběžně z krmítka umístěného nad aparaturou. Sběr potravy byl do experimentu zahrnut proto, aby potkany motivoval k aktivnímu zkoumání prostředí, což je zejména důležité v úlohách se sektorem definovaným v referenčním rámci arény.

Potkani byli trénováni ve dvacetiminutových sezeních jedenkrát denně (odstup 24 hodin). Po každém sezení byla aparatura očištěna vodou od mechanických nečistot, nebyla čištěna chemicky, určité pachové značky tedy mohly na povrchu a stěnách přetrvávat.

Procedura začínala čtyřmi předtréninkovými sezeními, kdy se zvířata seznamovala s arénkou a učila se sbírat dopadající potravu, aniž by se musela vyhýbat sektoru.

**První stupeň** vyhýbání se místu sestával z vyhýbání se stabilnímu sektoru na stojící aréně za světla (*Room/Arena*+ *avoidance*). Jedná se o úlohu pasivního vyhýbání se místu, tj. řešitelnou mj. i omezením lokomoce (Cimadevilla a kol., 2000) s poměrně malými kognitivními nároky – k dispozici jsou informace z referenčních rámců arény i místnosti, které jsou vzájemně stabilní. Všechny orientační body jsou tedy plně využitelné pro lokalizaci zakázané oblasti (Cimadevilla a kol., 2000, Wesierska a kol., 2005).

**Druhý stupeň** probíhal ve tmě, se zakázaným sektorem stabilním vůči povrchu arény, která v tomto případě rotovala (*Arena*+ *avoidance*). Potkani měli tudíž k dispozici jen idiothetickou navigaci a případné orientační body na samotné aréně (zejména pachové značky).

**Třetí stupeň** zahrnoval testování na rotující aréně za světla, pokryté 1 cm hlubokou vrstvou vody, skrývající pachové značky, zakázaný sektor byl v tomto případě definován vzhledem k místnosti (*Room*+ *avoidance*). Toto uspořádání testuje allothetickou navigaci (s pomocí vzdálených orientačních bodů), ale zároveň minimalizuje konflikt mezi referenčními rámci, protože zavádějící značky na povrchu arény (které nemohou posloužit k lokalizaci zakázané oblasti, protože aréna rotuje, zatímco sektor zůstává ve stejné poloze)



jsou skryty vodou a nemohou tedy potkana mást. Konflikt prostorových rámců ale není vyloučen zcela, zůstává totiž idiothetická informace, generovaná při vlastním pohybu zvířete (Stuchlik a kol., 2001). Na rozdíl od předešlých jsou 3. – 5. stupeň úlohami aktivního vyhýbání se místu, kde se potkan musí aktivně pohybovat aby unikl potrestání, v opačném případě je do zakázaného sektoru pasivně zavážen rotující arénou.

**Čtvrtý stupeň** byl uspořádáním totožný (i poloha sektoru v rámci místnosti zůstala stejná), aréna však byla bez vody ((Room)+/(Arena)-). Zde již je přítomen otevřený konflikt mezi prostorovými rámci, kdy jsou k dispozici informace jak ze stabilní místnosti, tak rotující arény. K vyřešení úlohy si potkan musí vybrat referenční rámec místnosti jako relevantní a naopak ignorovat zavádějící informace z referenčního rámce arény. Úloha tedy vyžaduje segregaci prostorových rámců a volbu jen jednoho z nich, což je mentální dovednost, jež je považována za období kognitivní koordinace u člověka (používání relevantních informací a ignorování těch irrelevantních).

**Pátý stupeň** vyhýbání probíhal za zcela stejných podmínek, poloha sektoru definovaného v rámci místnosti však byla změněna o 180°. Tato úloha testuje zároveň segregaci prostorových rámců i kognitivní flexibilitu, tj. schopnost reagovat na nové podmínky (Burghardt a kol., 2012).

**Tab. 3 Segregační baterie v kolotočovém bludišti – časové schéma pokusu**

Den	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Stupeň	0				1			2			3			4			5		
Úloha	Sbírání pelet				(Room/Arena+)			(Arena)+			(Room)+			(Room)+(Arena)-			(Room)+(Arena)- Reversal		
Zakázaný sektor	Ne				Ano			Ano			Ano			Ano			Ano		
Aréna	Stabilní				Stabilní			Rotující			Rotující			Rotující			Rotující		
Konflikt ref. rámců	Ne				Ne			Ne			Mírný			Ano			Ano		
Vodítka v rámci arény	Dostupná				Dostupná, relevantní			Dostupná, relevantní			Skrytá, irrelevantní			Dostupná, irrelevantní			Dostupná, irrelevantní		
Vodítka v rámci místnosti	Dostupná				Dostupná, relevantní			Skrytá, irrelevantní			Dostupná, relevantní			Dostupná, relevantní			Dostupná, relevantní		
Popis	Bez vyhýbání				Pasivní vyhýbání			Pasivní vyhýbání ve tmě			Aktivní vyhýbání, mělká voda na aréně			Aktivní vyhýbání			Aktivní vyhýbání, přeučení		
Testovaná dovednost	Sběr potravy				Prostorová navigace			Navigace v rámci arény			Navigace v rámci místnosti			Kognitivní koordinace			Kognitivní flexibilita		

### 3.2.3.2. Úloha aktivního vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti

Aktivní vyhýbání se místu je úlohou založenou na podobném principu jako poslední dva stupně segregační baterie. Potkani zde byli 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).

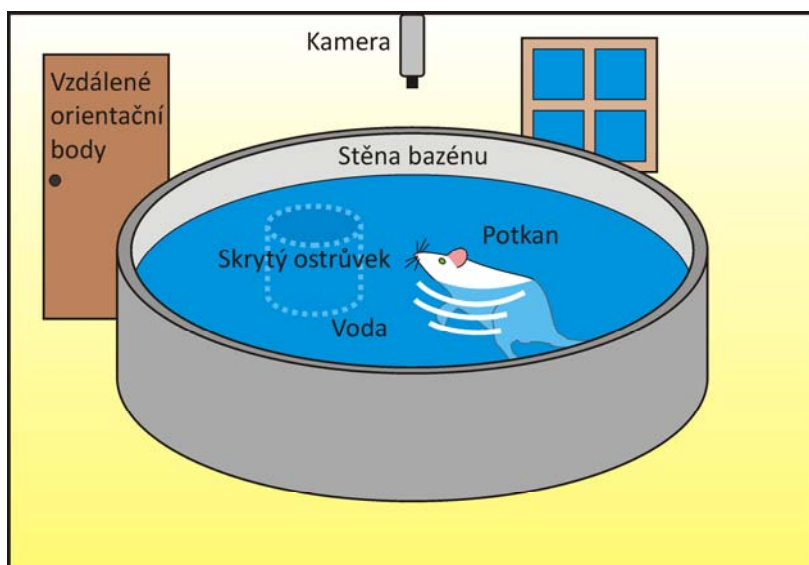
V experimentu bylo použito 18 potkanů ve věku 5 – 6 měsíců. Testovací sezení trvala vždy 20 minut. Prvních 5 dnů probíhala habituace, kdy potkani volně explorovali aparaturu, aniž by vykonávali jakoukoli definovanou úlohu, což lze považovat za určitou obdobu testu otevřeného pole. Dalších 5 dnů se vyhýbali sektoru v původní poloze (akvizice). Jeden den po ukončení akvizice následovalo pětiminutové sezení bez elektrického trestu (retrieval). Následovalo pětidenní přeučení (*reversal*) s odlišnou polohou zakázaného sektoru oproti akvizici (viz tab. 4).

Tab. 4 Aktivní vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti – časové schéma pokusu

Den	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Stupeň</b>	<b>Habituace</b>					<b>Akvizice</b>					<b>Reversal</b>				
<b>Úloha</b>	Přivýkání na arénu a manipulaci					(Room)+(Arena)-					(Room)+(Arena)-Reversal				
<b>Zakázaný sektor</b>	Ne					Ano					Ano				
<b>Aréna</b>	Stabilní		Rotující			Rotující					Rotující				
<b>Konflikt ref. rámců</b>	Ne					Ano					Ano				
<b>Vodítka v rámci arény</b>	Dostupná					Dostupná, irrelevantní					Dostupná, irrelevantní				
<b>Vodítka v rámci místnosti</b>	Dostupná					Dostupná, relevantní					Dostupná, relevantní				
<b>Popis</b>	Bez vyhýbání					Aktivní vyhýbání					Aktivní vyhýbání, přeučení				
<b>Testovaná dovednost</b>	Spontánní lokomoce					Kognitivní koordinace					Kognitivní flexibilita				

### 3.2.4. 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. 6). Úkolem potkanů bylo nalezení ostrůvku (plošinky) vyrobeného z plexiskla, o průměru 10 cm. Ostrůvek mohl být buď vnořený 1 cm nad hladinu a zvýrazněný tmavým okrajem (viditelný ostrůvek), anebo průhledný a ukrytý 1,5 cm pod hladinou (skrytý ostrůvek).



**Obr. 6 Morrisovo vodní bludiště**

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

(© Tomáš Petrásek)

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.

#### 3.2.4.1. Úloha s viditelným ostrůvkem

Ještě před zahájením kognitivního testování ve vodním bludišti byla zvířata trénována po dobu dvou dnů v úloze s viditelným ostrůvkem, přičemž každé sezení zahrnovalo osm plaveb. Potkani byli v tomto případě vypouštěni stále ze stejného místa, a poloha ostrůvku se mezi plavbami pseudonáhodně měnila. Potkani tedy nemohli použít prostorovou strategii (pamatovat si polohu ostrůvku), mohli ovšem navigovat na viditelný cíl, protože pozice ostrůvku byla zviditelněna pomocí tmavého nástavce, vyčnívajícího asi 1 cm nad hladinu.

### 3.2.4.2. Úloha *delayed-matching-to-place*

Úloha *delayed-matching-to-place* (DMP; popis úlohy viz 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. Na hipokampální funkci je obzvláště náročný, protože osvojení zabrání i unilaterální léze hipokampu, zatímco akvizici v klasické úloze vodního bludiště zablokuje teprve léze oboustranná (De Hoz a kol., 2005).

Potkani ve věku 4 měsíců (stejná skupina, která absolvovala segregáční baterii) podstupovali každý testovací den jedno sezení sestávající ze čtyř plaveb na skrytý ostrůvek. Pozice ostrůvku byla konstantní v rámci testovacího dne, ale ze dne na den se pseudonáhodně měnila. Optimální strategií k osvojení této úlohy je při první plavbě hledat ostrůvek náhodně (pokud jej potkan nenalezl do 1 minuty, byl k němu naveden experimentátorem), jeho pozici si zapamatovat a při dalších třech plavbách hledat místo zapamatované při plavbě první. Během experimentu byl manipulován interval mezi první (akviziční) a druhou plavbou (*inter-trial interval*, ITI). Tato prodleva mohla činit 15 sekund, 20 minut anebo 2 hodiny. Mezi druhou, třetí a čtvrtou plavbou byly konstantní intervaly 15 sekund, třetí a čtvrtá plavba sloužily především k tomu, aby si zvířata mohla být jista, že poloha ostrůvku je v rámci jednoho dne stále stejná. Potkani absolvovali osm sezení, pokaždé s jinou polohou ostrůvku. Místa vypuštění a ITI byla pseudorandomizována.

### 3.2.5. Chůze po laťce

Chůze po laťce (*beam walking*) je běžný test motorické koordinace (Goldstein, 1993). Potkan je při něm umístěn na vyvýšenou „kladinu“, jejíž jeden konec je ukončen bariérou, zatímco na druhém konci se nachází jeho domovská klec, kam se potkan přirozeně snaží dostat. Během prvních čtyř habituačních sezení potkani chodili po širší straně (5 cm) této latě, a to na postupně se prodlužující vzdálenost (0,5 m; 1 m; 2 m; 2 m), aby si osvojili princip úlohy. Další dvě habituační sezení, s latí otočenou užší stranou nahoru (šířka 1,5 cm), zahrnovala chůzi na vzdálenost 1 m a 2 m. Během testování zvířata musela 4× po sobě přejít dvoumetrovou vzdálenost po užší straně latě.

Testována byla stejná skupina zvířat jako v úloze aktivního vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti.

### **3.2.6. Test pasivního vyhýbání (*step-through avoidance*)**

Tato úloha je testem neprostorové dlouhodobé paměti. Aparatura sestává ze dvou oddílů. Jeden z nich je shora otevřený a jasně osvětlený (1500 lx), druhý je uzavřený a tmavý (<10 lx). Potkan je vložen do osvětlené části a má přirozenou tendenci vyhledat úkryt v tmavé části. Po vstupu jsou uzavřena padací dvířka mezi oběma kompartmenty. Čas vstupu je zaznamenán experimentátorem.

V experimentu byli použiti stejní potkani jako v úloze aktivního vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti, staří 7 – 8 měsíců. Ve dvou habituačních sezeních se potkani seznamovali s aparaturou. Ve třetím sezení (akvizice) jim byl po vstupu do tmavého oddělení udělen elektrický šok (1,5 mA) prostřednictvím kovové mřížky. Po 24 hodinách byli potkani vloženi do aparatury znovu (testovací sezení), přičemž prodloužení prodlevy do vstupu do tmavé části by mělo odrážet averzivní vzpomínku z předešlého dne. Pokud potkan do tmavého oddílu nevstoupil během pěti minut, sezení bylo ukončeno. V případě, že během akvizičního sezení nedošlo ke vstupu, byl daný jedinec z testovacího sezení vyloučen.

### **3.2.7. Neofobie/Anhedonie**

V této úloze byli potkani, držení 22 hodin bez vody a potravy, vloženi do aparatury se dvěma napáječkami. V jedné byla čistá voda, ve druhé voda oslazená (0,2% roztok sacharinu). Po jedné hodině bylo sezení ukončeno a napáječky zváženy, aby bylo možno určit množství vypité tekutiny. Sezení bylo opakováno po 24 hodinách.

V prvním sezení by mělo dojít ke konfliktu mezi příjemnou sladkou chutí a tendencí vyhýbat se neznámému (neofobie), protože potkani nikdy předtím oslazenou vodu neochutnali. Ve druhém sezení už byla zvířata s oslazenou vodou obeznámena a věděla, že je pro ně neškodná, spotřeba sladké a nesladké vody by tedy měla odrážet pouze jejich chuťové preference. Pokud by nepreferovali sladkou chuť (která je pro potkany obvykle stejně příjemná jako pro lidi), bylo by možné to interpretovat jako známku anhedonie (neschopnosti prožívat příjemné pocity a těšit se z prožitků) která je typická pro onemocnění jako je schizofrenie nebo deprese (Pelizza a Ferrari, 2009) a jejich animální modely (Le Pen a kol., 2002).

### 3.2.8. Statistické zpracování dat a sledované parametry

Zpracování dat zahrnutých do této práce jsem prováděl z největší části samostatně, s menší výpomocí ze strany dalších členů autorského týmu a konzultacemi s vedoucím práce. Finální statistická analýza dat je dílem Ing. Štěpána Bahníka. Postup statistického zpracování zde bude nastíněn jenom v obecných rysech, detailně je popsán v příložených publikacích.

Všechny analýzy byly provedeny v programu R (R Core Team, 2013).

#### 3.2.8.1. Kolotočové bludiště

Pohyb potkanů v kolotočovém bludišti byl zaznamenáván sledovacím programem Tracker (Biosignal Group, USA). Získaná data byla vyhodnocována v programech TrackAnalysis (Biosignal Group, USA) a CM Manager 0.3.5 (Bahník, 2013).

V úlohách kolotočového bludiště byly hodnoceny následující parametry:

**Celková dráha** představuje měřítko lokomoční aktivity. Počítána byla jako součet vzdáleností mezi polohami zvířete měřenými s krokem jedné sekundy. Pasivní pohyb (unášení arénou, pokud rotovala) byl automaticky odečítán sledovacím programem.

**Počet chyb** udává počet vstupů do zakázaného sektoru. Byl hodnocen jen v případě segregáční baterie, u druhé úlohy nikoli, protože silně koreluje s maximálním časem vyhýbání se a podává téměř totožnou informaci.

**Maximální čas vyhýbání se** je definován jako nejdelší časový interval mezi dvěma vstupy během konkrétního sezení.

**Průměrná vzdálenost od středu arény** byla měřítkem thigmotaxe (preferance míst u stěny oproti otevřenému prostornosti, souvisí s úzkostí). Tento parametr byl použit jen u druhé skupiny zvířat, která na aréně nepřijímala potravu.

**Defekace** byla hodnocena podle počtu exkrementů přítomných na aréně po skončení sezení. Tento parametr byl použit jen u druhé skupiny zvířat, která na aréně nepřijímala potravu.

**Čas do prvního vstupu** udává dobu uplynulou mezi začátkem sezení a první chybou. Může být měřítkem dlouhodobé paměti uchované z předešlého sezení. Čas do prvního vstupu se neukázal jako příliš spolehlivý parametr, protože zvířata na počátku sezení často do sektoru vstoupila omylem i v případech, kdy jeho pozici zjevně znala, což snižovalo vypovídací hodnotu této veličiny a zvyšovalo rozptyl naměřených hodnot. Proto byl tento parametr použit jen v případě segregáční baterie, ale ne úlohy aktivního vyhýbání se místu.

**Perseverance** (přetrvávající vyhýbání se původní poloze zakázaného sektoru i po jeho přemístění do jiné části arény) byla hodnocena jako poměr času stráveného v dřívějším trestaném sektoru vůči času strávenému ve všech netrestaných sektorech. Parametr byl počítán pouze ve stupni 5 segregáční baterie a v reversalové fázi aktivního vyhýbání se místu.

Data byla v případě nenormální distribuce logaritmičtě transformována, provedena byla i standardizace. Pro každý parametr byla následně provedena smíšená analýza rozptylu (*mixed-design ANOVA*), míra perseverace byla porovnána pomocí t-testu. Tyto postupy jsou podrobněji popsány v příslušných publikacích.

V úloze aktivního vyhýbání se místu se u některých jedinců při testování objevovala nápadná období strnulosti. Nehybná zvířata nemohou úlohu řešit a hodnocení jejich kognitivních schopností je tedy problematické: neschopnost aktivně se vyhýbat zakázanému sektoru nemusí být v tomto případě projevem kognitivního deficitu, nýbrž právě imobility (ať už je její příčina motorická nebo emocionální). V práci Petrásek a kol. (2014b) byla proto analyzována data jak ode všech subjektů, tak i s vyloučením těchto problematických zvířat. Imobilita byla nejvýraznější u tří zvířat z kontrolní skupiny. Aby selektivní vyřazení těchto jedinců neovlivnilo pozorované rozdíly, byli pro vyváženost vyřazení i tři nejhorší jedinci ze skupiny L2.

### 3.2.8.2. Morrisovo vodní bludiště

Ve vodním bludišti byla vyhodnocována **latence nalezení ostrůvku a uplavaná dráha**. Z nich bylo možné dopočítat také **průměrnou rychlost** potkana. Sledován byl dále podíl času stráveného v sektoru (o velikosti 45°), kde se ostrůvek nacházel předešlý den, jako měřítko **perseverance**. Tento parametr byl hodnocen pouze v úloze DMP, při první plavbě daného dne.

Data z prvních dvou testovacích dnů nebyla vyhodnocována, protože potkani ještě nebyli dostatečně obeznámeni s pravidly úlohy a jejich výkon nebyl příliš dobrý.

Pro konečnou analýzu jsme se nakonec rozhodli použít pouze hodnoty ze druhé plavby v každém sezení, které jsou reprezentativním ukazatelem jednorázového učení. Analyzována byla pouze dráha, která je objektivním ukazatelem, na rozdíl od doby nalezení ostrůvku, která může být ovlivněna rychlostí pohybu zvířete.

Logaritmičticky transformovaná uplavaná dráha během druhé plavby byla analyzována smíšenou analýzou rozptylu (mixed-design ANOVA). Perseverace byla porovnána pomocí Studentova t-testu.

Data z úlohy s viditelným ostrůvkem nebyla statisticky hodnocena. Doba do nalezení ostrůvku se i u téhož jedince měnila víceméně náhodně bez významné korelace, test se tedy jevil jako statisticky nespolehlivý (Cronbachova  $\alpha = 0,231$  a  $0,093$  pro standardizované latence nalezení ostrůvku v prvním a druhém sezení). To zřejmě odpovídá situaci, kdy potkani nacházeli ostrůvek zcela nahodile.

### 3.2.8.3. Chůze po latce

Hodnocen byl **čas do dosažení domovské klece**, **počet sklouznutí** (smeknutí jedné nohy z povrchu latě) a **počet pádů**. Hodnoty času do dosažení domovské klece neměly normální rozdělení, byla proto použita logaritmická transformace. Transformované hodnoty byly standardizovány pro každý běh v rámci dne, a následně byl spočítán průměr pro každé zvíře za všechna sezení, a tyto průměry dále standardizovány. K porovnání skupin byl použit Studentův t-test.

Počty sklouznutí a pádů byly sečteny za všechny běhy pro každé jednotlivé zvíře. V případě, že zvíře spadlo, byl mu do celkového skóre přičten nejvyšší počet sklouznutí pozorovaný u nejhoršího zvířete ze souboru (3) navýšený o jeden, tedy 4. Výsledné hodnoty byly porovnány Mann-Whitneyovým U-testem.

### 3.2.8.4. Test pasivního vyhýbání (*Step-through avoidance*)

Pro porovnání **latence vstupu do tmavého oddílu** během habituačních sezení a akvizičního sezení byla použita smíšená ANOVA, kde skupina (L2 nebo kontrolní) sloužila jako mezisubjektový faktor a sezení jako faktor v rámci subjektu. Pro faktor sezení byl použit polynomičtý kontrast. V testovacím sezení vstoupil do tmavého oddílu jen jediný potkan z celého souboru, analýzu tedy nebylo nutné provádět.

### 3.2.8.5. Neofobie/Anhedonie

Pro porovnání množství zkonsumovaného roztoku sacharinu byla použita smíšená ANOVA se skupinou jako mezisubjektovým faktorem a sezením jako faktorem v rámci subjektu. Protože celkové množství vypitých tekutin se u skupin mírně lišilo, byl jako závislá proměnná zahrnut i poměr zkonsumovaného sacharinu ku celkovému objemu vypité tekutiny.



### 3.3. Výsledky

#### 3.3.1. Kolotočové bludiště

Zvířata obou skupin byla evidentně schopná úlohy v kolotočovém bludišti řešit. Jejich schopnost pohybu byla zcela normální, a zrak (ač patrně zhoršený, viz kapitola 3.3.2.1.) byl dostatečný k prostorové navigaci, o čemž svědčí i úspěšné zvládnutí Morrisova vodního bludiště se skrytým ostrůvkem (viz níže). Také motivace k unikání ze zakázaného sektoru byla dostatečná.

##### 3.3.1.1. Segregační baterie

Ve fázi habituace se potkani obou skupin rychle naučili sbírat potravní pelety. V sezeních se zakázaným sektorem většinou reagovali na elektrickou ranku únikovou reakcí. Na grafech je patrné, že první dva stupně, vyžadující pouze pasivní vyhýbání, nejspíše nebyly pro zvířata příliš náročné, protože počet chyb byl nízký. Ve třetím stupni bylo již nutné aktivní vyhýbání se sektoru, a navíc byla arénka zaplavena mělkou vodou, na což zvířata reagovala podrážděností, zvýšením lokomoce a zhoršeným vyhýbáním se. Voda sama o sobě pro ně zřejmě byla nepříjemným podnětem, a výsledky z této fáze je proto třeba posuzovat opatrně. V pozdějších stupních, kdy voda na aréně nebyla, byla lokomoce i počet vstupů nižší. Čtvrtý stupeň znamenal vyostření konfliktu referenčních rámců (po odstranění vody měla zvířata přístup k zavádějícím pachovým značkám na povrchu arény), které ale nebylo doprovázeno zvýšením počtu chyb, zřejmě proto, že poloha sektoru zůstala stejná. Změna polohy sektoru ve stupni 5 byla zřejmě pro potkany náročnější a vedla ke zvýšenému počtu chyb. O tom, že potkani byli schopni úlohu účinně řešit ve stupních 3 – 5 vyžadujících aktivní vyhýbání, svědčí počet chyb i hodnoty maximálního času vyhýbání se. Při náhodném pohybu či imobilitě by se potkan měl do sektoru dostávat v průměru každou minutu (20 chyb za sezení), z grafů je ale patrné, že zvířata záhy dosáhla výrazně lepších výsledků, než by odpovídalo náhodě.

**Celková dráha** byla u L2 potkanů mírně zvýšená ( $M = 0,26$ ), rozdíl ale nebyl signifikantní  $F(1, 18) = 2,00$ ,  $p = 0,17$ ,  $\eta^2 = 0,10$ . Interakce mezi stupněm a skupinou nebyly signifikantní,  $F_s(1, 18) < 1,42$ ,  $p_s > 0,25$  (obr. 7A).

Pro **maximální čas vyhýbání se** byl signifikantní efekt skupiny  $ML2 = -0,29$ ,  $F(1, 18) = 5,43$ ,  $p = 0,03$ ,  $\eta^2 = 0,23$ . To ukazuje na obecně zhoršenou schopnost vyhýbat se zakázanému sektoru u L2 potkanů. Z prohlídky grafů se zdá, že tento rozdíl se zvyšoval v pozdějších a kognitivně náročnějších stupních, nicméně interakce skupiny a lineárního kontrastu pro stupně nebyla signifikantní  $F(1, 18) = 1,54$ ,  $p = 0,23$ , parciální  $\eta^2 = 0,08$ . Signifikantní nebyla ani interakce mezi skupinou a kvadratickým kontrastem stupňů,  $F(1, 18) < 1$  (obr. 7C).

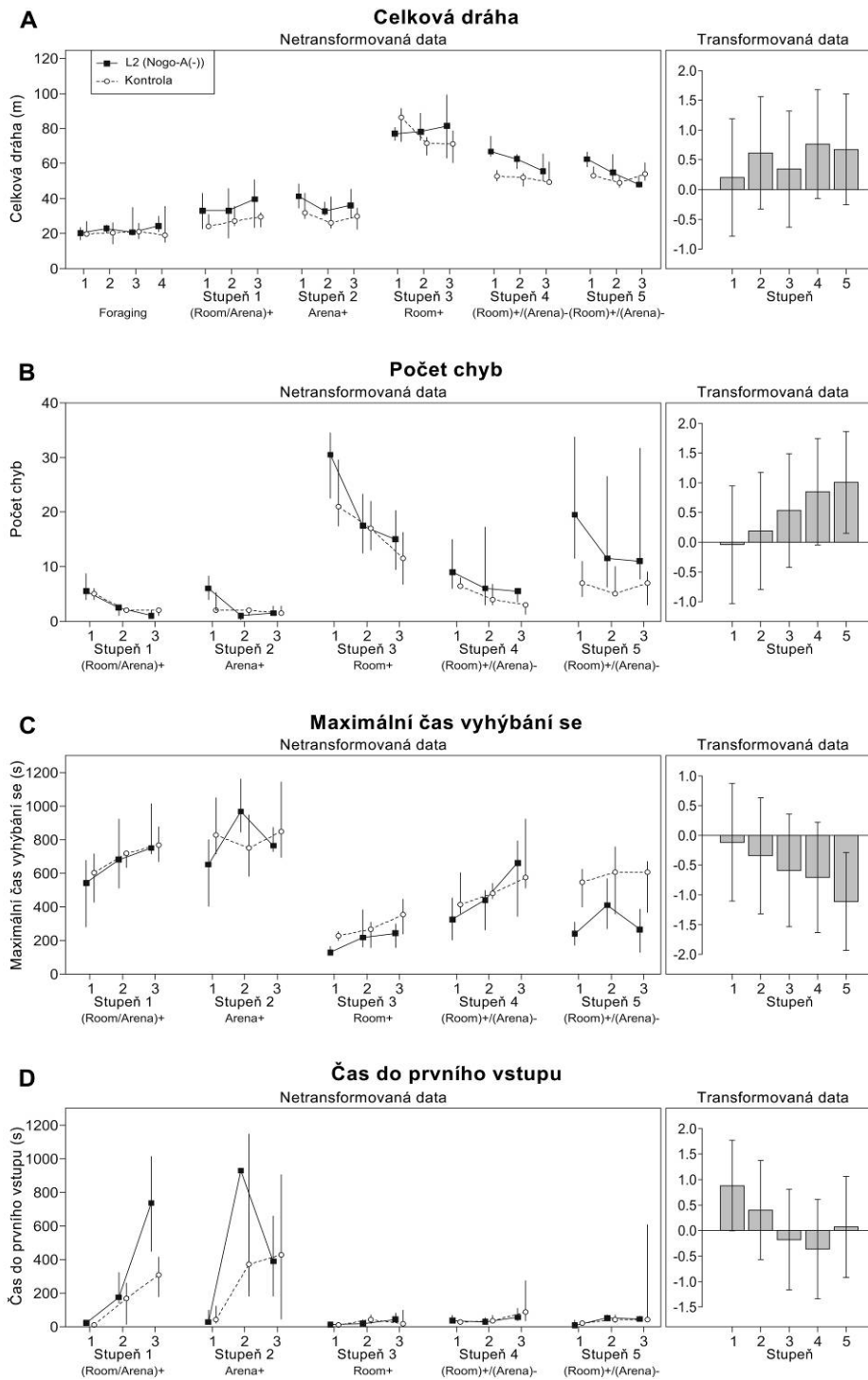
**Počet chyb** koreloval s maximálním časem vyhýbání se (medián korelace pro stejný stupeň byl  $-0,86$ ), proto byly podobné i výsledky analýzy ANOVA. Efekt skupiny zůstal pouze na úrovni trendu,  $ML2 = 0,25$ ,  $F(1, 18) = 3,81$ ,  $p = 0,07$ ,  $\eta^2 = 0,17$ . Grafy opět naznačují trend k rostoucím rozdílům směrem k pozdějším stupňům, interakce skupiny a lineárního kontrastu pro stupně ovšem nebyla významná  $F(1, 18) = 2,06$ ,  $p = 0,17$ , parciální  $\eta^2 = 0,10$ . Signifikantní nebyla ani interakce mezi skupinou a kvadratickým kontrastem stupňů,  $F(1, 18) < 1$  (obr. 7B).

ANOVA pro **čas do prvního vstupu** neukázala rozdíl mezi skupinami,  $F(1, 18) < 1$ . Byl zde ale náznak interakce mezi faktory skupiny a stupně,  $F(1, 18) = 2,63$ ,  $p = 0,12$ , dílčí  $\eta^2 = 0,13$  pro lineární kontrast a  $F(1, 18) = 3,51$ ,  $p = 0,08$ , parciální  $\eta^2 = 0,16$  pro kvadratický kontrast. L2 potkani vykazovali delší čas do prvního vstupu v prvních dvou stupních segregací baterie,  $ML2 = 0,32$ , a naopak zkrácený čas do prvního vstupu v dalších dvou stupních  $ML2 = -0,14$  (obr. 7D).

Co se týká **perseverace**, v 5. stupni potkani z linie L2 strávili o něco méně času v dříve zakázaném sektoru nežli kontrolní zvířata, rozdíl ale nebyl významný,  $t(18) = 1,15$ ,  $p = 0,27$ ,  $r = -0,26$ ,  $ML2 = -0,25$ , což ukazuje, že skupiny se nelišily v perseverativních tendencích. Perseverace se sice u některých jedinců objevila, ale nebyla typickým chováním ani u jedné skupiny.

Žádný jiný rozdíl ani trend se v datech neobjevil.

Celkově lze říci, že linie L2 si vedla hůře než kontroly v kognitivních parametrech, jako je maximální čas vyhýbání se a počet chyb. V grafech pro obě tyto veličiny lze vysledovat trend prohlubování tohoto rozdílu směrem k pozdějším stupňům úlohy, tato tendence ale nebyla shledána statisticky významnou.



**Obr. 7** Segregační baterie v kolotočovém bludišti

Vlevo netransformovaná data (mediány jednotlivých sezení s úsečkami vyznačujícími 1. a 3. kvartil). Vpravo transformovaná data pro jednotlivé stupně (rozdíl mezi průměry skupin s 95% konfidenčními intervaly). Chybové úsečky neslouží pro porovnávání rozdílů mezi stupni, ale pouze pro určení významnosti meziskupinových rozdílů. Pokud chybová úsečka neprotíná nulu, byl meziskupinový rozdíl v daném stupni signifikantní na hladině  $\alpha = 0,05$ . Panel A ukazuje lokomoční aktivitu (celková dráha). Panel B ukazuje počet chyb (vstupů). U skupiny L2 existoval trend k vyššímu počtu chyb ( $p = 0,07$ ) a jeho zvyšování v pozdějších stupních ( $p = 0,17$ ). Panel C ukazuje maximální čas vyhýbání se. Skupina L2 byla v tomto parametru signifikantně horší ( $p = 0,03$ ) a opět se postupně zhoršovala, avšak ani tento trend nebyl signifikantní ( $p = 0,23$ ). Panel D ukazuje čas do první chyby, měřítko dlouhodobé paměti. Ve stupních 3 – 5 se typicky blížil náhodné hodnotě (1 min), u zvířat z kontrolní skupiny ovšem častěji dosáhl nenáhodných hodnot (viz úsečky 3. kvartilu na konci stupňů 4 a 5).

### 3.3.1.2. Úloha aktivního vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti

Pozorování chování zvířat během experimentu neukázalo nic mimořádného během habituální fáze, ve fázi akvizice si většina jedinců rychle osvojila princip úlohy. U tří jedinců z kontrolní skupiny se ovšem během tréninku začala projevovat nápadná imobilita (strnulost), zpravidla přetrvávající po většinu sezení. Lze předpokládat, že tito potkani si v reakci na stresující podnět (elektrickou ranku) osvojili pasivní strategii (ztuhnutí) namísto aktivní (útěk). Protože aktivní lokomoce je nezbytným předpokladem pro zvládnutí úlohy, byli jedinci, pro něž bylo ztuhnutí dominantním typem chování, vyřazeni z další analýzy (vyřazeni byli i tři nejhorší potkani ze skupiny L2, aby nebyly selektivním vyřazením nejhorších jedinců z jedné skupiny zkresleny rozdíly mezi skupinami. Kritéria pro vyřazení jsou popsána v článku Petrásek a kol. (2014b).

Během habituace byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi skupinami v **celkové dráze**,  $t(14,93) = 2,37$ ,  $p = 0,03$ ,  $r = 0,51$ , přičemž skupina L2 vykazovala vyšší lokomoci (obr. 8A). Také **průměrná vzdálenost od středu arény** se lišila, přičemž kontrolní zvířata více preferovala prostor u stěn než potkani L2;  $t(13,15) = -3,99$ ,  $p = 0,002$ ,  $r = -0,71$  (obr. 8B). **Defekace** byla u kontrolní skupiny vyšší, ne však signifikantně;  $t(13,51) = -1,76$ ,  $p = 0,10$ ,  $r = -0,40$  (obr. 8C).

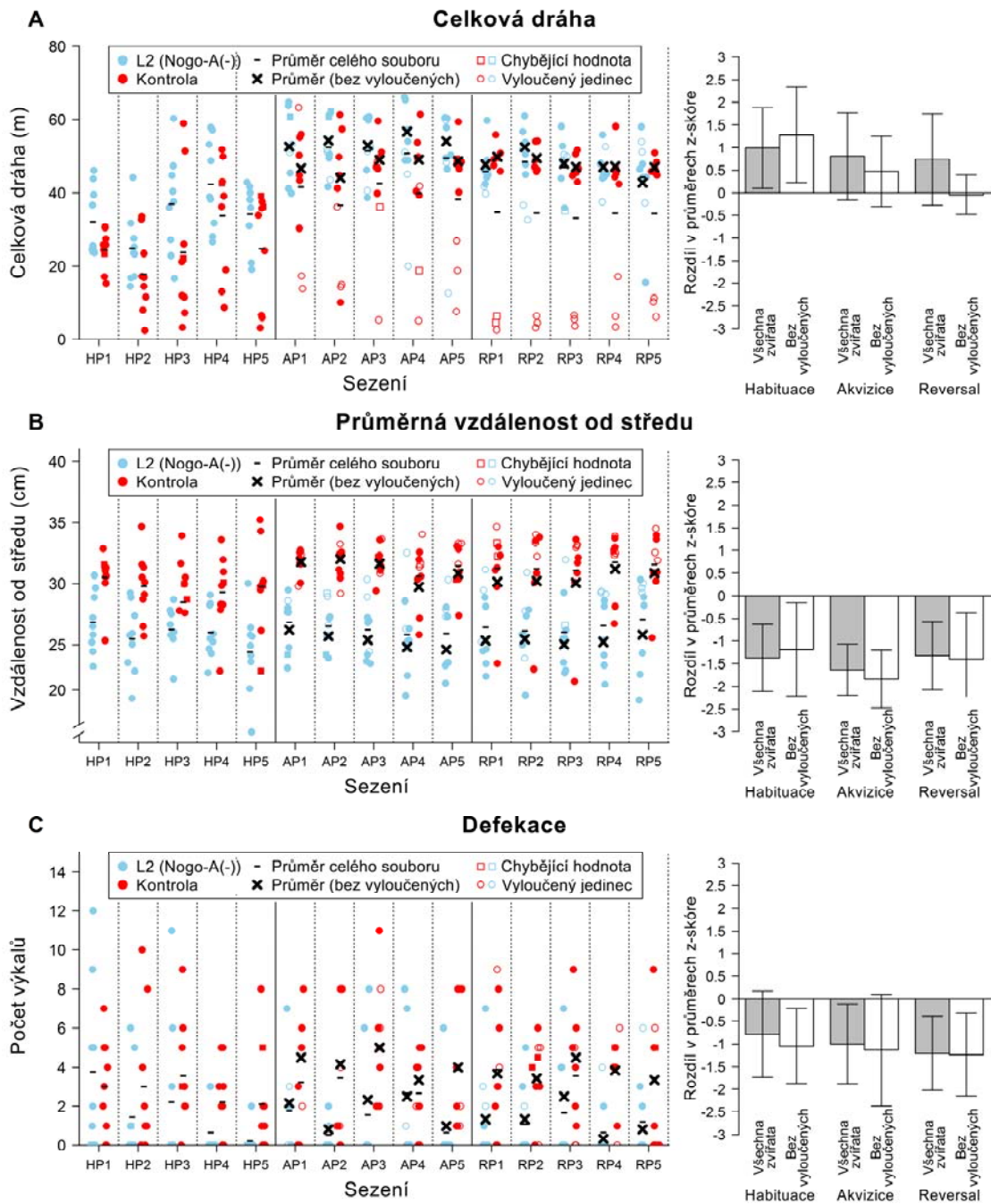
Pro stupně úlohy s kognitivním tréninkem, se započtením všech potkanů (bez vyloučení pasivních jedinců) analýza pro **maximální čas vyhýbání se** neukázala žádný efekt skupiny,  $F(1, 16) < 1$ ,  $p = 0,67$ ,  $\eta^2_G = 0,01$ , ani interakci mezi skupinami a tréninkovým stupněm,  $F(1, 16) = 1,41$ ,  $p = 0,25$ ,  $\eta^2_G = 0,02$  (obr. 9A). U **celkové dráhy** byl náznak efektu skupiny, přičemž kontrolní zvířata měla lokomoci sníženou,  $F(1, 16) = 3,55$ ,  $p = 0,08$ ,  $\eta^2_G = 0,16$ , interakce mezi skupinami a tréninkovým stupněm nebyla významná,  $F(1, 16) < 1$ ,  $p = 0,85$ ,  $\eta^2_G = 0,00$  (obr. 8A). Pro **průměrnou vzdálenost od středu arény** byla opět nalezena nižší vzdálenost od středu u L2 potkanů oproti kontrolám;  $F(1, 16) = 26,79$ ,  $p = 0,0001$ ,  $\eta^2_G = 0,58$ , a žádná interakce mezi skupinou a stupněm,  $F(1, 16) = 1,43$ ,  $p = 0,25$ ,  $\eta^2_G = 0,01$  (obr. 8B). Analýza ukázala sníženou **defekaci** u L2 skupiny;  $F(1, 16) = 10,04$ ,  $p = 0,006$ ,  $\eta^2_G = 0,32$ , bez interakce mezi faktory skupiny a stupně,  $F(1, 16) < 1$ ,  $p = 0,60$ ,  $\eta^2_G = 0,00$  (obr. 8C).

Při vyloučení tří potkanů z každé skupiny se ukázal významně snížený **maximální čas vyhýbání se** u skupiny L2 oproti kontrolám;  $F(1, 10) = 17,19$ ,  $p = 0,002$ ,  $\eta^2_G = 0,27$ , bez interakce mezi faktory skupiny a stupně,  $F(1, 10) = 1,07$ ,  $p = 0,33$ ,  $\eta^2_G = 0,08$  (obr. 9A).

U **celkové dráhy** nebyl v tomto případě ani efekt skupiny,  $F(1, 10) = 1,20$ ,  $p = 0,30$ ,  $\eta^2_G = 0,06$ , ani interakce mezi skupinou a stupněm;  $F(1, 10) = 1,78$ ,  $p = 0,21$ ,  $\eta^2_G = 0,08$  (obr. 8A). **Průměrná vzdálenost od středu arény** byla i po vyřazení pasivních jedinců nižší u skupiny L2, bez interakce mezi faktory skupiny a stupně;  $F(1, 10) = 1,44$ ,  $p = 0,26$ ,  $\eta^2_G = 0,03$  (obr. 8B). **Defekace** byla u skupiny L2 opět významně nižší;  $F(1, 10) = 7,24$ ,  $p = 0,02$ ,  $\eta^2_G = 0,37$ , interakce mezi skupinami a tréninkovým stupněm nebyla nalezena,  $F(1, 10) < 1$ ,  $p = 0,81$ ,  $\eta^2_G = 0,00$  (obr. 8C).

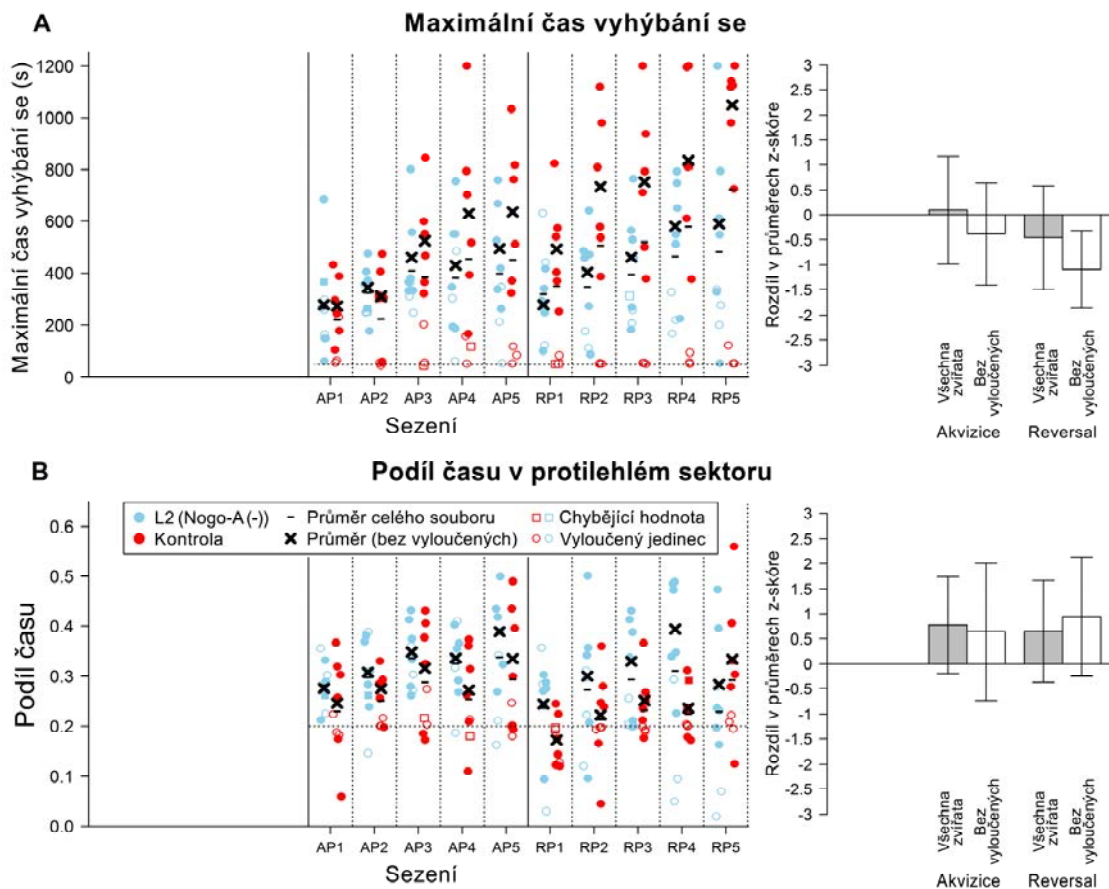
Analýza **perseverace** během přeučení neukázala žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami ani při započtení všech subjektů;  $t(10,40) = 1,40$ ,  $p = 0,19$ ,  $r = 0,33$ , ani po vyloučení nejhorších zvířat;  $t(6,70) = 1,89$ ,  $p = 0,10$ ,  $r = 0,51$ . V obou případech trávili jedinci z linie L2 v sektoru, jenž byl v předešlém stupni zakázaným, více času než kontrolní zvířata, což je zcela oproti očekávání vyšší perseverace (obr. 9B).

Data z retrievalového sezení nebyla hodnocena, protože byla neúplná: část byla ztracena kvůli technické chybě.



**Obr. 8** Aktivní vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti (nekognitivní parametry)

Vlevo netransformovaná data. V grafech jsou hodnoty jednotlivých zvířat v každém sezení habituace (HP), akvizice (AP) a přeučení (reversal, RP). Chybějící hodnoty byly dopočítány jako průměr ze sousedících hodnot pro stejné zvíře (nebyly použity ve statistické analýze popsané v textu). V akvizici a reversalu byli někteří jedinci z analýzy vyloučeni (zdůvodnění viz kapitoly 3.2.8.1. a 3.3.1.2.). Vpravo transformovaná data (použitá ke statistické analýze). Sloupcové grafy ukazují velikost rozdílu mezi skupinami pro jednotlivé stupně úloh, počítané z celého souboru (šedě) a po vyloučení problematických zvířat (bíle), chybové úsečky udávají 95% konfidenční interval rozdílu průměrů. Pokud úsečka neprotíná nulu, byl rozdíl mezi skupinami významný. Pokud je rozdíl pozitivní, měla L2 zvířata vyšší hodnoty daného parametru a naopak. Z grafů ale nelze odvozovat rozdíly mezi jednotlivými stupni. Panel A ukazuje rozdíly v lokomoční aktivitě. Již v habituaci vykazovali potkani L2 vyšší lokomoci a tato tendence přetrvávala i později, ovšem jen když jsou hodnocena všechna zvířata, což ukazuje, že rozdíl byl dán především vyloučenými jedinci z kontrolní skupiny, kteří se chovali převážně pasivně. Panel B zachycuje průměrnou vzdálenost potkanů od středu arény. Kontrolní skupina trávila mnohem více času u okraje arény, což může ukazovat na vyšší míru anxiety. Tuto interpretaci podporují i data v panelu D, ukazující míru defekace, která byla opět u kontrolních zvířat vyšší než u skupiny L2.



**Obr. 9** Aktivní vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti (kognitivní parametry)

Vlevo netransformovaná data. V grafech jsou hodnoty jednotlivých zvířat v každém sezení akvizice (AP) a přeučení (reversal, RP). Chybějící hodnoty byly dopočítány jako průměr ze sousedících hodnot pro stejné zvíře (nebyly použity ve statistické analýze popsané v textu). V akvizici a reversalu byli někteří jedinci z analýzy vyloučeni (zdůvodnění viz kapitoly 3.2.8.1. a 3.3.1.2.). Vpravo transformovaná data (použitá ke statistické analýze). Sloupcové grafy ukazují velikost rozdílu mezi skupinami pro jednotlivé stupně úlohy, počítané z celého souboru (šedě) a po vyloučení problematických zvířat (bíle), chybové úsečky udávají 95% konfidenční interval rozdílu průměrů. Pokud úsečka neprotíná nulu, byl rozdíl mezi skupinami významný. Pokud je rozdíl pozitivní, měla L2 zvířata vyšší hodnoty daného parametru a naopak. Z grafů ale nelze odvozovat rozdíly mezi jednotlivými stupni. Panel A ukazuje maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru (nejdelší interval bez vstupu). Při porovnání všech zvířat není patrný žádný rozdíl. Pokud jsou zahrnuti jen potkani kteří úlohu aktivně řešili, je rozdíl signifikantní (skupina L2 se vyhýbala hůře). Panel B ukazuje podíl času stráveného v sektoru ležícím naproti zakázanému. Ve fázi přeučení odpovídal protilehlý sektor zakázanému sektoru během akvizice. Perseverativní chování (přetrvávající vyhýbání dříve zakázanému sektoru) by se mělo projevit nízkými hodnotami. Je zajímavé, že potkani skupiny L2 trávili v protilehlém sektoru spíše více času (rozdíl nebyl signifikantní), což ukazuje, že navzdory celkově horší výkonnosti se u nich neprojevovala tendence ke zvýšené perseveraci. To je v rozporu s výsledky popsanými v literatuře. Vodorovná tečkovaná čára v grafu netransformovaných dat ukazuje hodnoty očekávané pro zcela nehybné zvíře. Je patrné, že vyloučení jedinci z kontrolní skupiny se drží této čáře velice blízko.

### 3.3.2. Morrisovo vodní bludiště

#### 3.3.2.1. Úloha s viditelným ostrůvkem

V této úloze se neprojevyly žádné významné rozdíly mezi skupinami. Při podrobnějším pohledu se ukázalo, že výsledky z po sobě následujících plaveb byly i u téhož jedince velmi rozmanité, a nevykazovaly známky zlepšování nebo cílené plavby na ostrůvek.

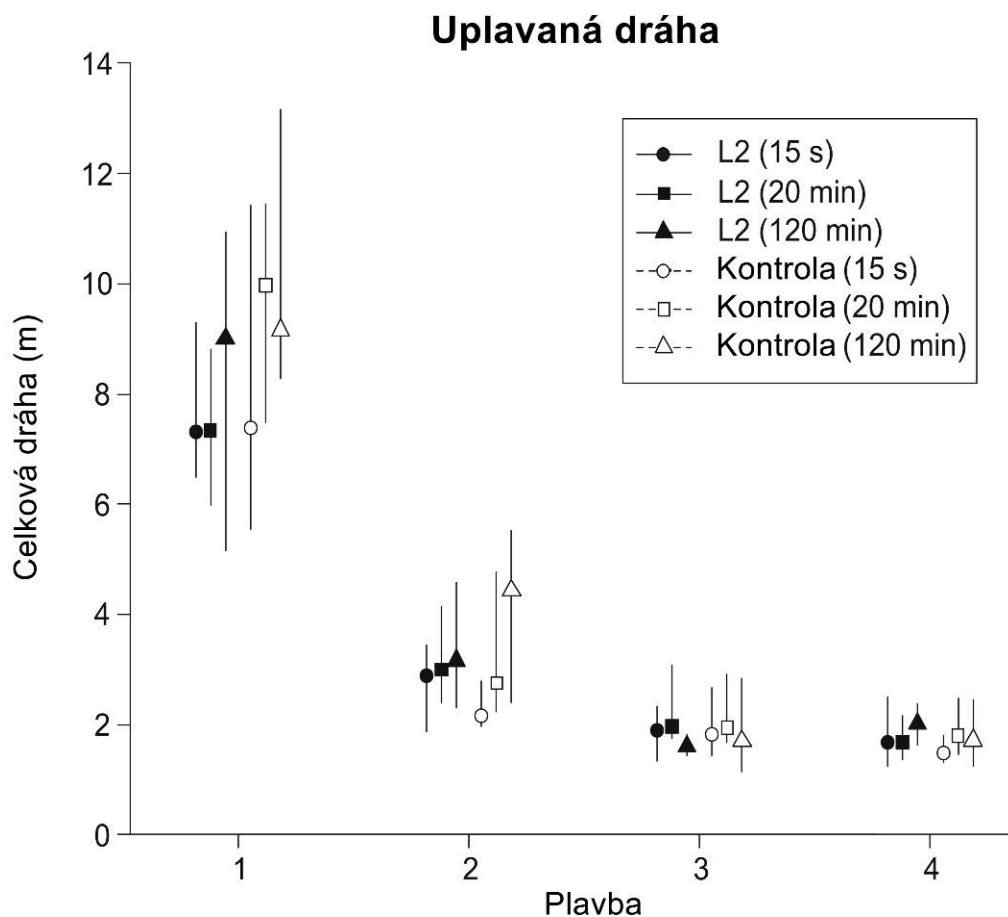
Zvířata sice byla fyzicky schopna plavání a motivovaná k nalezení ostrůvku, jak bylo zřejmé z jejich chování během testu, patrně ale nebyla schopna zrakem zaznamenat značku (tmavý vyvýšený nástavec) zviditelňující ostrůvek, a musela tedy hledat téměř náhodně. To ukazuje na špatnou zrakovou ostrost u potkanů kmene Sprague-Dawley. Jejich zrakové schopnosti nicméně byly dostatečné k řešení prostorových úloh s navigací na neviditelný cíl, tj. k navigaci vůči vzdálenějším orientačním bodům, jak je patrné z výsledků dalších experimentů.

#### 3.3.2.2. Úloha *delayed-matching-to-place* (DMP)

Výsledky z úlohy DMP ukazují významný lineární kontrast mezi první a druhou plavbou v uplavané dráze. Delší ITI vedla k delší uplavané dráze;  $F(1, 18) = 7,06$ ,  $p = 0,016$ , parciální  $\eta^2 = 0,28$  (obr. 10). To potvrzuje předpoklad, že vybavení naučené pozice ostrůvku po delší prodlevě je obtížnější. Žádný další efekt (skupiny, interakce ITI a skupiny, kvadratický trend pro ITI) nebyl pozorován, ve všech případech  $F_s(1, 18) < 1,2$ ,  $p_s > 0,29$ . Skupiny se nelišily ani ve výkonnosti v první, třetí a čtvrté plavbě.

Preference sektoru, kde se ostrůvek nacházel předešlého dne, se nelišila mezi L2 ( $M = 0,123$ ) a kontrolami ( $M = 0,134$ ),  $t(18) = 0,55$ ,  $p = 0,59$ ,  $r = -0,13$ , což ukazuje že tendence k perseveraci byly u obou skupin podobné.





**Obr. 10 Morrisovo vodní bludiště, úloha DMP**

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 (ITI) mezi první a druhou plavbou. Pro jednotlivá sezení (dny) byla poloha ostrůvku odlišná. Při první plavbě každého sezení zvířata hledala ostrůvek vždy náhodně, při následujících již mohla jeho polohu znát, délka uplavané dráhy ve druhé plavbě odrážela znalost polohy ostrůvku získanou při první plavbě. 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.

### 3.3.3. Chůze po laťce

V celkovém skóre se skupiny L2 ( $M = 0,20$ ) a kontrolní ( $M = -0,20$ ) od sebe nelišily;  $t(16) = 0,83$ ,  $p = 0,42$ . Nelišily se ani v počtu sklouznutí (Mann-Whitney  $U = 38,5$ ,  $n_{L2} = n_{\text{control}} = 9$ ,  $p = 0,89$ ) a pádů (Mann-Whitney  $U = 31,0$ ,  $n_{L2} = n_{\text{control}} = 9$ ,  $p = 0,45$ ).

### 3.3.4. Test pasivního vyhýbání (*Step-through avoidance*)

Smíšená ANOVA latence vstupu do tmavého oddílu ukázala významný efekt skupin;  $t(16) = 2,29$ ,  $p = 0,04$ ,  $r = 0,50$ , trend v lineárním kontrastu sezení,  $t(32) = -1,94$ ,  $p = 0,06$ ,  $r = -0,32$ , a nesignifikantní kvadratický kontrast pro sezení,  $t(32) = 0,29$ ,  $p = 0,78$ ,  $r = 0,05$ . Interakce mezi lineárním kontrastem sezení a skupinou byla

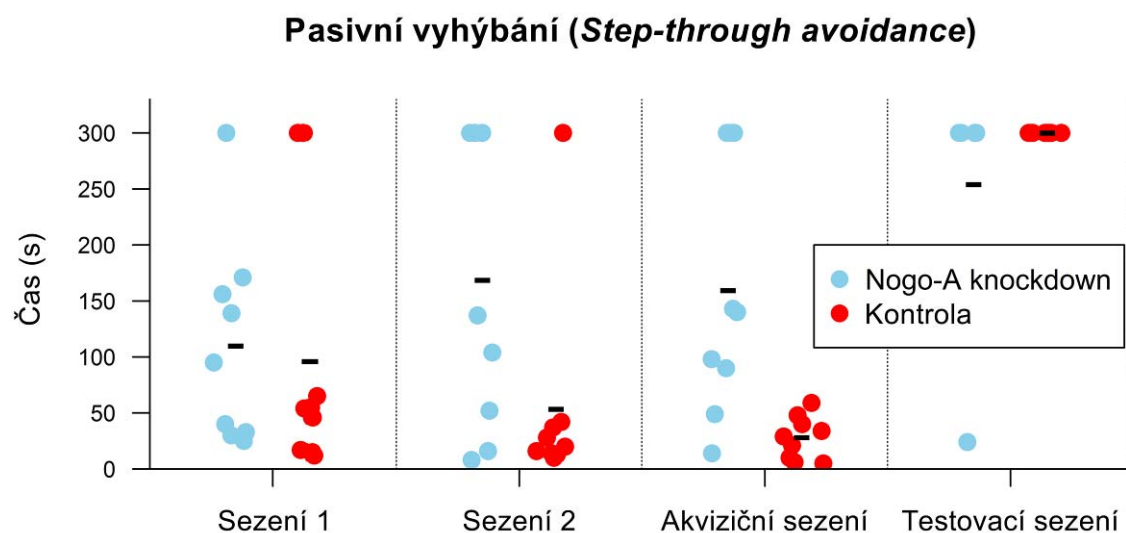
signifikantní;  $t(32) = 2,37$ ,  $p = 0,02$ ,  $r = 0,38$ , zatímco interakce pro kvadratický kontrast sezení a skupiny nikoli,  $t(32) = -0,99$ ,  $p = 0,33$ ,  $r = -0,17$ .

ANOVA s opakovanými měřeními provedená odděleně pro obě skupiny ukázala, že u skupiny L2 byl koeficient lineárního kontrastu pozitivní, ačkoli nesignifikantní;  $t(16) = 1,46$ ,  $p = 0,16$ ,  $r = 0,34$ , pro kontrolní skupinu byl negativní a okrajově signifikantní  $t(16) = -1,88$ ,  $p = 0,08$ ,  $r = -0,42$ .

Interakce byla dále prozkoumána pomocí Welchova t-testu, který byl nezávisle proveden pro každé sezení. V prvním sezení se skupiny nelišily;  $t(15,13) = 0,28$ ,  $p = 0,78$ ,  $r = 0,07$ , ale skupina L2 vykazovala delší latence ve druhém,  $t(14,46) = 2,15$ ,  $p = 0,05$ ,  $r = 0,47$ , a třetím sezení;  $t(8,46) = 3,44$ ,  $p = 0,008$ ,  $r = 0,65$  (obr. 11).

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.

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.

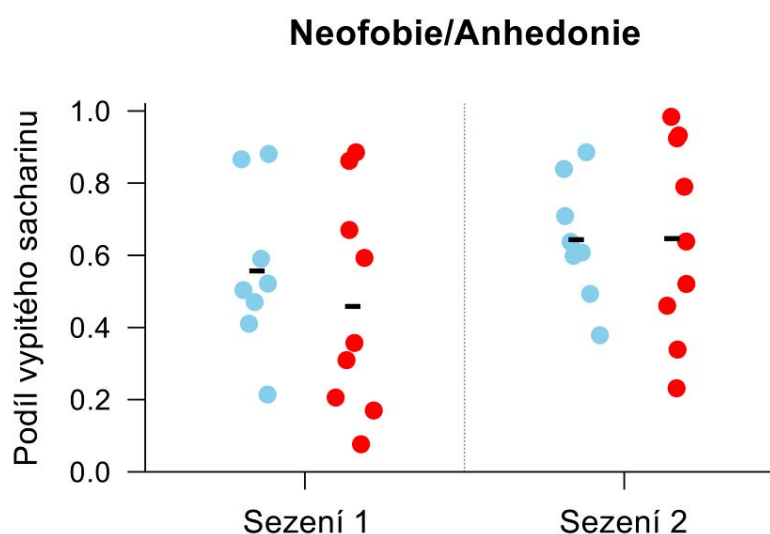


**Obr. 11 Test pasivního vyhýbání**

Jednotlivé body reprezentují čas do vstupu do tmavého oddělení pro jednotlivé potkani. Vodorovná černá čárka ukazuje průměr. V průběhu sezení 1 – 3 (bez averzivní zkušenosti) se prohluboval rozdíl mezi skupinami – kontrolní potkani vstupovali do neosvětlené části aparatury čím dál tím dříve, zatímco u skupiny L2 byl trend opačný. Při akvizičním sezení byl vstup do tmavého oddílu potrestán elektrickým šokem. Pokud potkani do neosvětleného kompartmentu nevstoupili do 5 minut (časový limit délky sezení), byli z experimentu vyloučeni. V testovacím sezení potkani po předchozí zkušenosti do tmavého oddílu nevstupovali vůbec (s jedinou výjimkou).

### 3.3.5. Neofobie/Anhedonie

Všechna zvířata během sezení ochutnala a konzumovala nabízené tekutiny. V druhém sezení byla celková konzumace vyšší než v prvním. V poměru vypité oslazené vody vůči celkovému množství požité tekutiny nebyl nalezen efekt skupiny;  $F(1, 15) < 1$ ,  $p = 0,60$ ,  $\eta^2_G = 0,01$ , ani sezení,  $F(1, 15) = 2,71$ ,  $p = 0,12$ ,  $\eta^2_G = 0,08$ , ani žádná interakce mezi oběma faktory;  $F(1, 15) < 1$ ,  $p = 0,55$ ,  $\eta^2_G = 0,01$  (obr. 12).



**Obr. 12 Neofobie/Anhedonie**

Potkani byli dva dny po sobě umístěni do aparatury s pítky obsahujícími vodu a sladký roztok. V prvním sezení pili celkově méně než ve druhém (neukázáno), zřejmě v důsledku přivyknutí na nové prostředí. Výsledky jsou znázorněny jako poměr vypitého roztoku sacharinu k celkovému množství zkonsumované tekutiny během prvního a druhého sezení. Očekávána byla obecně nižší preference sladkého roztoku v prvním sezení, kdy byl pro potkany neznámý (neofobie) a případně snížená preference sladké chuti u skupiny L2 jako projev anhedonie. Mezi skupinami ani sezeními ovšem nebyl patrný rozdíl v poměru vypité oslazené vody k celkovému množství zkonsumované tekutiny.

## 3.4. Diskuse

### 3.4.1. Ověření validity použitého modelu

Snížení exprese proteinu Nogo-A u linie L2 bylo v původní studii Tews a kol. (2013) kvantifikováno metodou Western blot na zhruba 70 % normální hodnoty v hipokampu, koncentrace příslušné mRNA klesla na přibližně 50 %. U zvířat použitých v této studii bylo zjištěno  $77,9 \pm 5,5$  % proteinu v hipokampu, a  $59,1 \pm 7,5$  % Nogo-A mRNA tamtéž (analýzu prováděl M. Sládek a K. Weissová z odd. Neurohumorálních regulací FgÚ AV, viz Fig. 1 v práci Petrásek a kol., 2014b). Dobrá shoda mezi měřeními ukazuje na to, že transgenní insert skutečně funguje, a snížení exprese Nogo-A bylo i po kvantitativní stránce velmi podobné u zvířat používaných v této práci a ve studii Tews a kol. (2013).

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

V úloze segregáční baterie vykazovali L2 potkani nesignifikantně zvýšenou lokomoci a signifikantní deficit v kognitivních parametrech (počet chyb a maximální čas vyhýbání se, viz obr. 7B a C). Čas do prvního vstupu (obr. 7D) se zde neukázal jako příliš spolehlivý parametr, protože zvířata na počátku sezení často do sektoru vstoupila omylem i v případech, kdy jeho pozici zjevně znala, což snižovalo vypovídací hodnotu této veličiny a zvyšovalo rozptyl naměřených hodnot. V prvních dvou stupních, kde byl sektor stabilní vzhledem k povrchu arény, měla skupina L2 obecně čas do prvního vstupu vyšší, ačkoli celkový počet chyb byl u nich srovnatelný nebo vyšší než u kontrol. Tento rozdíl by mohl být způsoben nižší lokomocí L2 potkanů na počátku sezení, protože v těchto stupních byla řešena úloha pasivního vyhýbání. Ve stupních 3 – 5, kdy se zvířata musela sektoru vyhybat aktivně, byl naopak čas do prvního vstupu u L2 zvířat stejný nebo kratší než u kontrol. Při aktivním vyhýbání ovšem medián pro čas do prvního vstupu ani u jedné ze skupin typicky nepřesahoval 60 sekund, tj. dobu jedné otočky arény, což znamená, že k prvnímu vstupu docházelo spíše náhodně.

Z grafů na obr. 7 je zjevné, že ve všech kognitivních ukazatelích (počet chyb, maximální čas vyhýbání se, čas do prvního vstupu) je kognitivní 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.

Ve třetím stupni segregáční baterie, kde byla aréna zaplavena vodou, byl patrný významný nárůst lokomoce i počtu chyb u obou skupin. Podílel se na tom bezpochyby fakt, že zvířata byla silně rozrušena přítomností vody, která jim patrně byla nepříjemná a navíc mohla měnit vnímání elektrického trestání.

V úloze aktivního vyhýbání se místu byly kognitivní požadavky velmi podobné posledním dvěma stupňům segregáční baterie, potkani se ovšem soustředili jen na averzivně motivované vyhýbání, potravní motivace chyběla. Lokomoce u obou skupin byla srovnatelná (obr. 8A), skupina L2 si ale vedla významně hůře v kognitivním aspektu úlohy, měřeném maximálním časem vyhýbání se (obr. 9A). Toto poškození bylo ještě výraznější během přeučení. To opět ukazuje na poškozenou schopnost segregace prostorových rámců s možným příspěvkem snížené flexibility v 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 v kapitolách 3.3.1.2 a 3.4.3) ale nebyly nalezeny výraznější změny v lokomoci, motorické funkce byly také zcela normální (viz kapitola 3.4.5). Zraková ostrost byla u potkanů obou skupin sice nízká, avšak domníváme se, že srovnatelná. Vyloučit ovšem nelze deficit pozornosti, který by rovněž mohl vést ke zhoršenému vyhýbání v kolotočovém bludišti, protože u použitého animálního modelu nebyly žádné testy zaměřené specificky na pozornost prováděny.

Celkově vzato výsledky ukázaly, že potkani s uměle sníženou expresí Nogo-A jsou oproti kontrolním jedincům na kolotočovém bludišti kognitivně horší. V obou použitých úlohách byl přítomen významný kognitivní deficit, projevující se zejména v ukazatelích počet chyb a maximální čas vyhýbání se.

Ke zvládnutí úlohy aktivního vyhýbání se místu, respektive posledních dvou stupňů segregací baterie, potřebují potkani schopnost prostorové navigace, která jim umožňuje lokalizovat zakázaný sektor (který je sám o sobě neviditelný), ale také schopnost třídit orientační body do dvou samostatných reprezentací a z nich zvolit tu správnou. 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). Specifický deficit této funkce u L2 zvířat ukazuje na postižení podobné kognitivním symptomům schizofrenie.

V obou úlohách byl také přítomen trend (byť nesignifikantní), ukazující na vyostření kognitivního deficitu u skupiny L2 v podmínkách přeučení, tj. po změně polohy zakázaného sektoru. Vzhledem k vysokým kognitivním nárokům a patrně i zvýšené míře stresu to není zcela překvapivé. Zhoršená kognitivní flexibilita v podmínkách přeučení v prostorové úloze (vodní T-bludiště) byla navíc již zaznamenána u myší (Willi a kol., 2010) i potkanů (Tews a kol., 2013) s potlačenou expresí Nogo-A. V obou těchto případech byla připsána perseveraci, tj. neúčelnému ulpívání na dříve naučeném vzorci chování (viz kapitola 2.4.). Ve zde popsaných experimentech ovšem perseverativní chování, v podobě neúčelného vyhýbání se dřívějšímu sektoru, nebylo nikdy výrazné a mezi skupinami se nelišilo ani na úrovni trendu (obr. 9B). Skupina L2 tedy měla problém osvojit si novou polohu sektoru, aniž by lpěla na dříve naučeném vyhýbání.

Celková dráha byla u skupiny L2 nesignifikantně zvýšena v segregací baterii, a dokonce signifikantně vyšší během habituace v úloze aktivního vyhýbání se místu (obr. 7A a 8A). Nabízela by se paralela s hyperlokomocí pozorovanou v modelech schizofrenie a také u myší s delecí genu pro Nogo-A (Willi a kol., 2009). Lokomoce v kolotočovém bludišti je ovšem ovlivněna také mírou stresu a prostorovou strategií zvířat, nelze ji tedy jednoznačně srovnávat se spontánní lokomocí v testu otevřeného pole.

### **3.4.3. 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. U několika jedinců se dokonce objevila dlouhodobá imobilita (freezing) trvající po dobu několika sezení (jak je patrné na obr. 8A). Podobné chování v obdobné úloze již bylo u kmene Sprague-Dawley dříve popsáno (Carr a kol., 2011), a lze předpokládat, že jde o strnulost coby pasivní reakci na ohrožení,

kteřá se zřejmě může dlouhodobě upevnit mechanismem naučené bezmocnosti. U skupiny L2 se takoveto chování objevovalo zřídka a nikdy nepřetržovalo přes více dnů.

Protože úloha aktivního vyhýbání se místu už ze své definice vyžaduje aktivní lokomoci, a nehybná zvířata v ní nemohou nijak projevit své kognitivní schopnosti, museli být tito jedinci z analýzy vyloučeni.

Dokonce i po vyloučení pasivně se chovajících zvířat byly zbývající kontroly úzkostnější než jedinci skupiny L2, na což poukazuje výrazná thigmotaxe a vyšší defekace (obr. 8B a C).

Tento rozdíl v emocionalitě byl zjevně přítomen již před první 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 habituální fázi úlohy pasivního vyhýbání (kapitola 3.4.6). Dá se tedy předpokládat, že i rozdíly v četnosti a dlouhodobosti pasivního chování mezi L2 a kontrolami byly podmíněny nižší anxiétou u L2 zvířat. V úlohách segregační baterie se pasivní chování prakticky neobjevovalo – pravděpodobně je to dáno tím, že zvířata se kromě vyhýbání zakázanému sektoru věnovala také sbírání čokoládových pelet, což patrně usnadnilo upevnění aktivních behaviorálních strategií anebo snížilo míru stresu.

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

#### **3.4.4. 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, byly tedy schopny používat vzdálené orientační body k lokalizaci skrytého cíle. Schopnost osvojit si pozici ostrůvku během jediné plavby a uchovat ji po různě dlouhou dobu rovněž nebyla sníženou expresí Nogo-A ovlivněna (obr. 10). Na základě výsledků popsanych v literatuře (viz kapitola 2.4.) 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.

#### **3.4.5. Knockdown Nogo-A neovlivní sensorimotorické schopnosti potkanů**

Test chůze po laťce neukázal žádné problémy s motorickou koordinací, což je v souladu s poznatky zjištěnými z literatury, kde rovněž nebyly motorické poruchy u podobných modelů nalezeny (Kim a kol., 2003a, 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 nebyl závažný (tj. nezabránil použití prostorové navigační strategie), patrně proto, že zvířata měla k dispozici dostatečně velké a kontrastní orientační body či alespoň gradienty světla a stínu v prostředí, popř. i nevizuální zdroje prostorových informací (např. akustické).

#### **3.4.6. Neprostorová paměť v úloze pasivního vyhýbání i habituace na novou chuť jsou zachovány**

V testu pasivního vyhýbání si obě skupiny úspěšně zapamatovaly averzivní zkušenost s elektrickou ránou v tmavém kompartmentu, do něhož i po 24 hodinách naprostá většina potkanů odmítla vstoupit. Lišilo se ale jejich chování během prvních tří sezení (kdy se seznamovali s aparaturou ještě před averzivním podnětem). Kontrolní jedinci preferovali tmavou část aparatury a v následujících sezeních do ní vstupovali stále dříve, latence vstupu se u L2 potkanů nijak nezkracovala nebo se dokonce prodlužovala (obr. 11). S přihlédnutím k výsledkům v kolotočovém bludišti můžeme usuzovat, že méně úzkostní potkani linie L2 nebyli natolik motivovaní hledat úkryt v neosvětleném oddílu aparatury.

Chování při vystavení sladkému roztoku se u L2 potkanů nijak nelišilo, jejich neofobie i chuťová preference jsou tedy podobné jako u nemodifikovaných potkanů (obr. 12).

#### **3.4.7. Změny v cirkadiánním rytmu**

Cirkadiánní rytmy v celkové aktivitě byly sledovány ve spolupráci s odd. Neurohumorálních regulací FgÚ AV. Výsledky ukázaly, že i zvířata ze skupiny L2 vykazují normální cirkadiánní rytmicitu. V podmínkách trvalé tmy byl ovšem rytmus v lokomoční aktivitě výraznější u L2 zvířat (poměr mezi aktivitou během subjektivní noci a subjektivního dne byl vyšší). Celková aktivita L2 potkanů ale nebyla zvýšená, nýbrž naopak spíše menší. Za normálního denního režimu se tento rozdíl nevyskytoval, šlo tedy zřejmě o projev odlišného nastavení vnitřních biologických hodin (viz Fig. 6 v práci Petrásek a kol., 2014b).

U transgenních myší pozorovali Willi a kol. (2009) zvýšenou aktivitu v tmavé fázi denního cyklu, což by mohlo odpovídat těmto pozorovaným změnám.



### 3.4.8. Neurochemické změny a abnormální stárnutí u L2 zvířat

Křištofiková a kol. (2013) popisují výsledky analýzy mozků L2 potkanů. Studie byla zaměřena na expresi podjednotek NMDA glutamátového receptoru (NR1, NR2A a NR2B) ve frontální kůře a aktivitu tří izoform NO syntázy (nNOS, eNOS a iNOS) v parietální kůře, jejich lateralizaci (poměr mezi pravou a levou hemisférou) a vzájemné korelace.

Stimulace NMDA receptoru aktivuje syntézu NO stimulací příslušných syntáz, které jsou spojeny s NMDA receptory pomocí tzv. postsynaptic density proteinu. Expres i lateralizace NMDA receptorů a NOS enzymů se přitom významně mění při neuropsychiatrických poruchách.

U mladých kontrol nebyla nalezena žádná lateralita podjednotek NMDA receptoru. Naopak u nNOS a iNOS byla zaznamenána lateralizace u některých jedinců: přibližně třetina zvířat nebyla lateralizovaná, u třetiny byla vyšší aktivita vpravo a u další třetiny vlevo.

U starších kontrol (použitá jednorocní zvířata byla spíše ve středním věku než skutečně stará) byl nalezen pokles exprese NR1 bilaterálně, zvýšená exprese NR2B vpravo, bilaterální nárůst aktivity nNOS a naopak pokles eNOS. U iNOS byla výrazná levo-pravá asymetrie.

Mladá L2 zvířata nebyla od kontrol odlišná v expresi podjednotek NMDA receptoru, vykazovala však zvýšenou aktivitu iNOS vlevo.

U starých L2 potkanů došlo k bilaterálnímu zvýšení exprese NR1. V aktivitě iNOS se objevila pravo-levá asymetrie, tedy opačná než u stejně starých kontrol.

Situace u L2 zvířat se v některých aspektech liší od lidských pacientů se schizofrenií. Není zde zřejmý celkový nárůst exprese NR2B, který je pro mozky schizofreniků typický. Zvýšenou aktivitu iNOS vlevo a změny ve vzájemných korelacích mezi studovanými molekulami u mladých L2 zvířat ovšem lze považovat za předčasnou manifestaci změn souvisejících s věkem (podobné změny byly viditelné u starších kontrol). Určité změny podobné předčasnému stárnutí jsou pozorovány i u schizofreniků (Kirkpatrick a kol., 2008). U starých L2 zvířat tyto změny nicméně nepokračují, naopak nárůst exprese NR1 a některé změny v korelacích mezi NO syntázami jdou v opačném směru, než změny u starých kontrol. Narušené korelace mezi studovanými proteiny u L2 zvířat by mohly ukazovat na dysregulaci frontoparietální interakce především v pravé hemisféře, což je opět styčný bod se schizofrenií.

Celkově lze tedy říci, že aktivita NO syntáz a exprese NMDA receptorových podjednotek se u L2 zvířat liší od kontrol a také se odlišně vyvíjí v čase. Některé z těchto změn souhlasí s očekáváními pro model schizofrenie, jiné nikoli.

V literatuře byly souvislosti mezi expresí podjednotek NMDA receptorů a Nogo-A již popsány, závěry jsou ale dosti protichůdné. Case (2011) ve své práci prováděla cílený knockdown Nogo-A v neuronech vyvíjejícího se potkaního neokortexu metodou RNA interference. Výsledkem byly jednak změny v morfologii synaptických trnů, jednak změny exprese markerů synaptické plasticity. Co se týče NMDA receptorových podjednotek, exprese mRNA pro NR2B významně klesla (o 86 %), zatímco u NR2A bylo snížení rovněž viditelné, ale statisticky nesignifikantní. Protože poměr mezi NR2A a NR2B je důležitý pro vyvolání plasticity závislé na aktivitě (*use-dependent plasticity*), lze předpokládat, že delecce Nogo-A ovlivňuje plasticitu právě tohoto typu. Peng a kol. (2011) ve své studii našli naopak zvýšení exprese podjednotek NR1, NR2A a NR2B po zablokování exprese Nogo-A v hipokampálních neuronech *in vitro*.

V rámci studia L2 zvířat jsme se rovněž pokoušeli na samostatné skupině zhodnotit vliv stárnutí na chování, s cílem zjistit, zda se s věkem kognitivní deficit u L2 potkanů neprohlubuje (T. Petrásek, nepublikovaná data). Výsledky pilotního experimentu však nebyly jednoznačné, zejména vzhledem k malému počtu zvířat, který nebyl dostatečný ke statistickému zpracování (n = 5-6). Vizuální prohlídka dat ukázala, že jeden rok stará zvířata obou skupin nejsou nijak zjevně kognitivně postižena, v kolotočovém bludišti i vodním bludišti si vedla podobně či lépe než půlroční. Rozdíl mezi L2 a kontrolami v takto malém souboru nebyl viditelný.

Ve věku nad 1 rok se však začíná objevovat nápadně zvýšená mortalita u L2 potkanů (stáří 18 měsíců se nedožilo 6/11 L2 potkanů, ale jen 1/10 SD potkanů). Jeden z L2 potkanů musel být utracen kvůli těžké poruše hybnosti (kvadruparéza). Z důvodu mortality a omezeného počtu zvířat jsme nakonec od experimentů zaměřených na stárnutí upustili.

Příčiny úmrtí L2 zvířat se nám určit nepodařilo. V této souvislosti lze uvažovat jak o negativním vlivu samotné snížené exprese Nogo-A (například v souvislosti s jeho neuroprotektivním působením), tak i o nesespecifických vedlejších účincích samotné genové manipulace (narušení funkce jiného genu, toxicita EGFP).

Vzhledem k tomu, že Nogo-A prokazatelně hraje roli v patologickém stárnutí a neurodegenerativních poruchách (viz kapitoly 2.3.1 a 2.3.2), a změny v procesu stárnutí doprovázené vyšší mortalitou jsou patrné i u schizofrenie (Kirkpatrick a kol., 2008), bylo by důkladnější prozkoumání behaviorálních i biochemických aspektů stárnutí u L2 potkanů a případně i příčin jejich mortality zajisté zajímavým tématem pro další výzkum.

### **3.4.9. Celková interpretace**

Z provedených behaviorálních experimentů je zřejmé, že L2 potkani vykazují významné zhoršení v úlohách kolotočového bludiště. Patrně jde o sníženou schopnost kognitivní koordinace (nakládání se dvěma soubory vzájemně nesouhlasných orientačních bodů) a kognitivní flexibility. Naopak učení, krátkodobá i dlouhodobá paměť a schopnost přesné prostorové navigace u nich postiženy nejsou, o čemž svědčí nenarušený výkon v úlohách pasivního vyhýbání a Morrisova vodního bludiště.

Výkon v kolotočovém bludišti je silně závislý na hipokampu (Wesierska a kol., 2005), a to ještě výrazněji než v Morrisově vodním bludišti (Kubik a Fenton, 2005). Poškození hipokampu narušuje také behaviorální flexibilitu (Kimble a Kimble, 1965). Protože hipokampus patří ke strukturám s nejvyšší expresí Nogo-A vůbec, předpokládáme, že by i zde popsaný deficit mohl být hipokampální povahy.

Na molekulární úrovni snížená exprese Nogo-A usnadňuje vznik LTP i jiných forem synaptické plasticity (Delekate a kol., 2011, Zagrebelsky a kol., 2010), přičemž LTP je neurálním podkladem formování paměťových stop (Pastalkova a kol., 2006, Serrano a kol., 2008). Posílení signalizace přes Nogo-A skutečně vede ke zhoršení paměťových funkcí, ať už k němu dojde umělým navýšením exprese NgR1 (Karlén a kol., 2009) nebo přirozeným zvýšením exprese Nogo-A ve stárnoucím mozku (Vanguilder a kol., 2011, 2012).

Skutečnost, že také snížení exprese Nogo-A vede ke kognitivním deficitům, se může zdát protimyslná, nicméně je třeba připomenout, že problémy pozorované u L2 zvířat v této práci nebyly zřejmě paměťového charakteru. U zvířat s potlačenou expresí Nogo-A je paměť jako taková většinou zachovaná, zato však je u nich pozorována snížená kognitivní flexibilita (Willi a kol., 2010, Tews a kol., 2013). Není nemyslitelné, že míra exprese Nogo-A a tím i synaptické plasticity v hipokampu je normálně nastavena na určitou optimální hodnotu, přičemž snížení i zvýšení poškozuje hipokampální funkce. Důležitá je navíc i lokalizace Nogo-A v buňkách, přičemž zde použitý transgenní potkan s potlačením exprese především neuronálního Nogo-A může vykazovat odlišné projevy než modely s delecí neuronální i gliální exprese tohoto proteinu.

Na základě zde popsaných výsledků můžeme formulovat hypotézu, že v hipokampu L2 potkanů není narušena tvorba paměťových stop, ovšem je snížena schopnost rozlišovat mezi různými vstupy nebo reprezentacemi (což by se mohlo týkat jak rozlišování referenčních rámců v úloze aktivního alotetického vyhýbání se místu, tak i rozlišování mezi relevantní a irrelevantní vzpomínkou během přeučení). K jejímu otestování by ovšem bylo nutno prozkoumat tyto funkce také v dalších úlohách.

Poškození kognitivní flexibility, pozorované ve starších studiích ve vodním T-bludišti (Willi a kol., 2010, Tews a kol., 2013) bylo připisováno perseveraci. Rozlišení mezi skutečnou perseverací a pouhým pomalejším osvojením nové polohy cíle zde ale bylo problematické, neboť v T-bludišti má zvíře na výběr pouze dvě možné odpovědi. Při přeučení v kolotočovém bludišti se ovšem potkani mohou současně vyhýbat jak původnímu, tak i nově definovanému zakázanému sektoru, a lze tedy nezávisle hodnotit jak osvojování si pozice nového, tak přetrvávající vyhýbání se starému sektoru. Díky tomu jsme zjistili, že deficit L2 potkanů ve fázi přeučení není doprovázen přehnaně perseverativním chováním.

Také v Morrisově vodním bludišti jsme nezaznamenali žádný náznak perseverace. To dopovídá výsledkům Willi a kol. (2009), kde změna polohy ostrůvku v Morrisově bludišti (úloha testující referenční paměť) také neodkryla žádný deficit přeučení u myšího modelu. Je tedy možné, že deficit kognitivní flexibility je závislý na použitém testu, zvířecím modelu nebo obou faktorech.

#### **3.4.10. Nogo-A knockdown 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 sensorimotorického gatingu (potlačená 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., 2008a). 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, což potvrzují i výsledky Enkel a kol. (2014) sledující vnímavost k odměně, tito autoři nicméně odhalili u linie L2 změny v hodnocení poměru mezi úsilím a získanou odměnou.

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).

Zajímavé může být porovnání L2 potkanů se zavedenými modely schizofrenie. Farmakologický dizocilpinový model (Bubenikova-Valesova a kol., 2008b, Vales a kol., 2006), spočívající v akutní administraci dizocilpinu (MK-801) je poměrně dobře charakterizovaný. Dizocilpin vyvolává hyperlokomoci a ve vyšších dávkách i motorické problémy. Není zcela zřejmé, zda je ke kognitivnímu deficitu po podání dizocilpinu citlivější kolotočové nebo vodní bludiště. Stuchlik a kol. (2004) zjistili narušení aktivního vyhýbání se místu v kolotočovém bludišti teprve v dávce 0,2 mg/kg, zatímco navigace v Morrisově vodním bludišti byla zhoršena již při 0,1 mg/kg. Některé novější experimenty (Lobellova a kol., 2013, Vojtěchová, 2014) však poukazují naopak na vyšší citlivost kolotočového bludiště, což odpovídá pozorováním u linie L2. Dizocilpinový model i knockdown Nogo-A jsou si každopádně podobné v tom, že narušují výkonnost přednostně v přeučení (Lobellova a kol., 2013). Zajímavé je, že u dizocilpinu je pozorovatelný anxiolytický efekt (byť jej nelze počítat mezi schizofrenii podobné projevy), který prokazatelně může v úloze kolotočového bludiště potlačovat tendenci k pasivnímu chování (D. Klement, nepublikovaná data, Vojtěchová, 2014), což je podobné situaci, kterou vidíme u potkanů linie L2 (viz kapitoly 3.3.1.2 a 3.4.3).

Jako příklad neurovývojového modelu můžeme použít model neonatální léze ventrálního hipokampu (NVHL), který je široce používaný a dobře charakterizovaný (Lecourtier a kol., 2012, Swerdlow a kol., 2012). Lee a kol. (2012) zjistili, že potkani s NVHL jsou v dospělosti zhoršení v kolotočovém bludišti, a to zejména v přeučení na změněnou polohu sektoru, což se shoduje s našimi pozorováními u potkanů se sníženou expresí Nogo-A. Jsou ale výrazně zhoršení také v Morrisově bludišti a vykazují výraznou spontánní hyperlokomoci (Beninger a kol., 2009), což u L2 zvířat neplatí.

Porovnávání a hodnocení modelů schizofrenie je nicméně problematické. O etiologii této choroby víme jen velmi málo, pravděpodobně je podmíněna souhrou celé řady faktorů. U animálních modelů můžeme tedy nanejvýš hodnotit fenomenologickou validitu. Ani v této kategorii ale neexistují jednoznačná kritéria, podle nichž by se dala relevance modelu posoudit (Lipska a Weinberger, 2000).

Animální modely se sníženou či zablokovanou expresí Nogo-A vykazují poměrně dobrou fenomenologickou validitu, zejména velmi konzistentně narušený senzomotorický gating a období kognitivních symptomů schizofrenie, a také některé symptomy negativní. Pozitivní symptomy však podle všeho chybějí. Je proto možná správnější hovořit v tomto případě o modelu endofenotypů schizofrenie, tedy příznaků přítomných u nemocných osob i mimo akutní ataky choroby (viz např. Budel a kol., 2008). Přítomnost jen některých skupin symptomů a chybění jiných je však u animálních modelů schizofrenie obvyklá, a je běžná i u lidských pacientů trpících touto chorobou, neboť schizofrenie je ve svých projevech značně různorodá. To, že potkani linie L2 vykazují především kognitivní a negativní symptomy, může být ve skutečnosti výhodné pro jejich případnou aplikaci při vývoji nových antipsychotik. Třebaže tyto skupiny symptomů jsou pro kvalitu života a společenské uplatnění pacientů nejzávažnější, dosud nebylo možné vyvíjet jejich účinnou léčbu, protože nebývají manifestovány v tradičních animálních modelech schizofrenie (Jones a kol., 2011).

Narušení signalizace přes Nogo-A se může podílet na vzniku schizofrenie také u lidí, přinejmenším v některých případech (Willi a Schwab, 2013), proto jsou L2 potkani modelem zajímavým i z etiologického hlediska. Existuje dokonce hypotéza, podle níž důležitou úlohu v patogenezi schizofrenie hrají přirozeně vznikající miRNA regulující genovou expresi (Beveridge a Cairns, 2012, Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011, Xu a kol., 2012, přehled viz Willi a Schwab, 2013). V tomto případě by dokonce i mechanismus snížení exprese Nogo-A byl obdobný. To činí z transgenních potkanů linie L2 jeden z nemnoha modelů schizofrenie aspirujících na konstrukční validitu.

### 3.5. 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 očekáváním byla u zvířat se sníženou expresí Nogo-A zaznamenána snížená míra anxiety. Nepodařilo se prokázat deficit pracovní paměti, ani sníženou citlivost k příjemným podnětům.

Na základě těchto pozorování se potkani se sníženou expresí Nogo-A jeví jako perspektivní animální model schizofrenie, a to zejména jejich kognitivních symptomů.

Výsledky shrnuté v této práci při uvážení všeho, co o Nogo proteinech a jejich funkci víme, otevírají řadu zajímavých problémů pro budoucí výzkum.

Popsané experimenty se týkaly jen dospělých jedinců v poměrně úzkém věkovém rozmezí. Víme však, že Nogo-A ovlivňuje vývoj mozku pre- i postnatálně, a zásadním způsobem se podílí i na procesu stárnutí. Studium vývojového aspektu problematiky, tj. změn v chování a biochemii od narození až po pokročilé stáří, by proto umožnilo mnohem hlubší pochopení funkce Nogo-A v mozku a snad i jeho relevance v patologii.

Bez zajímavosti by nebylo ani ověření funkčnosti modelu na jiném genetickém pozadí. Celá řada prací na transgenních myších s vyřazeným Nogo-A dokládá, že dopad na neuroplasticitu je u různých kmenů velmi odlišný (viz kapitola 2.2.1.1), totéž bychom tedy mohli očekávat i u behaviorálních projevů podobné manipulace.

Z hlediska modelu psychózy by bylo jistě zajímavé aplikovat u potkanů linie L2 dodatečnou zátěž, například psychotomimetická farmaka, infekci v raném věku nebo psychický stres, a tak se přiblížit předpokládané etiologii schizofrenie, kde se podle většiny autorů kombinují faktory genetické a environmentální.

## 4. SHRnutí

Výsledky popsané v této práci ukazují na rozdíly v chování mezi potkany se sníženou expresí Nogo-A a kontrolními jedinci.

Neprostorová paměť v úloze pasivního vyhýbání i prostorová paměť a navigace v Morrisově vodním bludišti jsou zcela normální, v úlohách kolotočového bludiště se ale objevuje nápadný deficit. Z toho lze usoudit, že snížená exprese Nogo-A vede ke specifickému zhoršení kognitivní koordinace a flexibility, které připomíná kognitivní symptomy schizofrenie.

Přihlédneme-li k biochemickým stanovením klíčových proteinů a jejich laterality (Kristofikova a kol., 2013), jsou naše výsledky konzistentní s hypotézou spojující sníženou expresí Nogo-A se schizofrenií podobným chováním u laboratorního potkana.

## SUMMARY

Results described in this thesis demonstrate behavioral differences between the rats with decreased Nogo-A expression and wild-type controls.

Non-spatial long-term memory, assessed in the passive avoidance task, and spatial memory and navigation in the Morris Water Maze, were normal, whereas in the Carousel Maze tasks, notable cognitive deficit was apparent. This leads to conclusion that Nogo-A deficiency leads to a very specific impairment of cognitive coordination and flexibility, resembling cognitive symptoms of schizophrenia.

When taken together with the biochemical assessment of key proteins expression and laterality in the brain by Kristofikova et al. (2013), our results are consistent with the proposed link between decreased Nogo-A levels and schizophrenia-like behavior in the rat.



## 5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdel Baki, S. G., Kao, H. Y., Kelemen, E., Fenton, A. A., Bergold, P. J., 2009. A hierarchy of neurobehavioral tasks discriminates between mild and moderate brain injury in rats. *Brain Res*, 1280, 98–106.
- Acevedo, L., Yu, J., Erdjument-Bromage, H., Miao, R. Q., Kim, J. E., Fulton, D., Tempst, P., Strittmatter, S. M., Sessa, W. C., 2004. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nature medicine*, 10(4), 382-388.
- Adelson, J. D., Barreto, G. E., Xu, L., Kim, T., Brott, B. K., Ouyang, Y. B., Naserke, T., Djuricic, M., Xiong, X., Shatz, C. J., Giffard, R. G., 2012. Neuroprotection from stroke in the absence of MHCI or PirB. *Neuron*, 73(6):1100-7. doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.020.
- Akbik, F., Cafferty, W. B., Strittmatter, S. M., 2012. Myelin associated inhibitors: a link between injury-induced and experience-dependent plasticity. *Experimental neurology*, 235(1), 43-52.
- Akbik, F. V., Bhagat, S. M., Patel, P. R., Cafferty, W. B., Strittmatter, S. M., 2013. Anatomical plasticity of adult brain is titrated by Nogo Receptor 1. *Neuron*, 77(5), 859-866.
- Aloy, E. M., Weinmann, O., Pot, C., Kasper, H., Dodd, D. A., Rulicke, T., Rossi, F., Schwab, M. E., 2006. Synaptic destabilization by neuronal Nogo-A. *Brain Cell Biol* 35:137–156.
- Anderson, D. J., Hetzer, M. W., 2008. Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation. *J. Cell Biol.* 182, 911–924.
- Atwal, J. K., Pinkston-Gosse, J., Syken, J., Stawicki, S., Wu, Y., Shatz, C., Tessier-Lavigne, M., 2008. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science*, 322(5903), 967-970.
- Audhya, A., Desai, A., Oegema, K., 2007. A role for Rab5 in structuring the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 178:43-56.
- Bahnik, S., 2013. Carousel Maze Manager (Version 0.3.5) [Software]. Available from [https://github.com/bahniks/CM\\_Manager\\_0\\_3\\_5](https://github.com/bahniks/CM_Manager_0_3_5)
- Bandtlow, C. E., Schmidt, M. F., Hassinger, T. D., Schwab, M. E., Kater, S. B., 1993. Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones. *Science*, 259(5091):80-3.
- Bandtlow, C. E., Dlaska, M., Pirker, S., Czech, T., Baumgartner, C., Sperk, G., 2004. Increased expression of Nogo-A in hippocampal neurons of patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci.* 20(1):195-206.
- Bareyre, F. M., Haudenschild, B., Schwab, M. E. 2002. Long-lasting sprouting and gene expression changes induced by the monoclonal antibody IN-1 in the adult spinal cord. *J Neurosci.* 22(16):7097-110.
- Bastmeyer, M., Beckmann, M., Schwab, M. E., Stuermer, C. A., 1991. Growth of regenerating goldfish axons is inhibited by rat oligodendrocytes and CNS myelin but not by goldfish optic nerve tract oligodendrocyte-like cells and fish CNS myelin. *J. Neurosci.* 11:626–640.
- Beaud, M. L., Schmidlin, E., Wannier, T., Freund, P., Bloch, J., Mir, A., Schwab, M. E., Rouiller, E. M., 2008. Anti-Nogo-A antibody treatment does not prevent cell body shrinkage

in the motor cortex in adult monkeys subjected to unilateral cervical cord lesion. *BMC Neurosci.* 9:5. doi: 10.1186/1471-2202-9-5.

Beninger, R. J., Tuerke, K. J., Forsyth, J. K., Giles, A., Xue, L., Boegman, R. J., & Jhamandas, K., 2009. Neonatal ventral hippocampal lesions in male and female rats: effects on water maze, locomotor activity, plus-maze and prefrontal cortical GABA and glutamate release in adulthood. *Behav Brain Res*, 202(2), 198-209.

Beveridge, N. J., Cairns, M. J., 2012. MicroRNA dysregulation in schizophrenia. *Neurobiol Dis.* 46(2):263-71. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.029.

Bish, J. P., Ferrante, S. M., McDonald-McGinn, D., Zackai, E., Simon, T. J., 2005. Maladaptive conflict monitoring as evidence for executive dysfunction in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Developmental Science*, 8(1), 36-43.

Bonal, C. B., Baronnier, D. E., Pot, C., Benkhoucha, M., Schwab, M. E., Lalive, P.H., Herrera, P. L., 2013. Nogo-A downregulation improves insulin secretion in mice. *Diabetes*, 62(5):1443-52. doi: 10.2337/db12-0949.

Boric, K., Muñoz, P., Gallagher, M., Kirkwood, A., 2008. Potential adaptive function for altered long-term potentiation mechanisms in aging hippocampus. *J Neurosci.* 28:8034-9.

Borrie, S. C., Baeumer, B. E., Bandtlow, C. E., 2012. The Nogo-66 receptor family in the intact and diseased CNS. *Cell and tissue research*, 349(1), 105-117.

Borrie, S. C., Sartori, S. B., Lehmann, J., Sah, A., Singewald, N., Bandtlow, C. E., 2014. Loss of Nogo receptor homolog NgR2 alters spine morphology of CA1 neurons and emotionality in adult mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8.

Bradbury, E. J., Moon, L. D. F., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., Fawcett, J. W., McMahon, S. B., 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881):636-40.

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., 2008a. 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.

Bubenikova-Valesova, V., Stuchlik, A., Svoboda, J., Bures, J., Vales, K., 2008b. Risperidone and ritanserin but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 105, 1061–1066. doi:10.1073/pnas.0711273105

Budel, S., Padukkavidana, T., Liu, B. P., Feng, Z., Hu, F., Johnson, S., Lauren, J., Park, J. H., McGee, A. W., Liao, J., Stillman, A., Kim, J. E., Yang, B. Z., Sodi, S., Gelernter, J., Zhao, H., Hisama, F., Arnsten, A. F., Strittmatter, S. M., 2008. Genetic variants of Nogo-66 receptor with possible association to schizophrenia block myelin inhibition of axon growth. *The Journal of Neuroscience*, 28(49), 13161-13172.

Buffo, A., Zagrebelsky, M., Huber, A. B., Skerra, A., Schwab, M. E., Strata, P., Rossi, F., 2000. Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons. *J Neurosci.* 20(6):2275-86.

- Bunney, W. E., Bunney, B. G., 2000. Evidence for a compromised dorsolateral prefrontal cortical parallel circuit in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev.* 31(2-3):138-46.
- Burghardt, N. S., Park, E. H., Hen, R., Fenton, A. A., 2012. Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*, 22, 1795–808.
- Burke, S. N., Barnes, C. A., 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci.* 7:30-40.
- Cafferty, W. B., Strittmatter, S. M., 2006. The Nogo–Nogo receptor pathway limits a spectrum of adult CNS axonal growth. *The Journal of neuroscience*, 26(47), 12242-12250.
- Cafferty, W. B., Kim, J. E., Lee, J. K., Strittmatter, S. M., 2007. Response to correspondence: Kim et al., “axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B.” *Neuron* 38, 187–199. *Neuron*, 54(2), 195.
- Cafferty, W. B., Duffy, P., Huebner, E., Strittmatter, S. M., 2010. MAG and Omgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. *The Journal of Neuroscience*, 30(20), 6825-6837.
- Cafferty, W. B., Strittmatter, S. M., 2010. Limitation of adult CNS axonal growth by the NOGO/NGR1 pathway. In: 2010 Meeting of AXON GUIDANCE, SYNAPTIC PLASTICITY & REGENERATION, September 21–September 25, 2010, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B. S., Filbin, M. T., 2001. Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *The Journal of Neuroscience*, 21(13):4731-9.
- Caltharp, S. A., Pira, C. U., Mishima, N., Youngdale, E. N., McNeill, D. S., Liwnicz, B. H., Oberg, K. C., 2007. NOGO-A induction and localization during chick brain development indicate a role disparate from neurite outgrowth inhibition. *BMC Dev Biol.* 7:32.
- Caroni, P., Schwab, M. E., 1988a. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *The Journal of cell biology*, 106(4), 1281-1288.
- Caroni, P., Schwab, M. E., 1988b. Antibody against myelin associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*, 1(1), 85-96.
- 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. doi:10.1097/ANA.0b013e3182049f19
- Case, A. M., 2011. Effects of Neuronal Nogo-A on Properties of Excitatory Synapses of the Sensorimotor Cortex. Dissertations. Paper 192. [http://ecommons.luc.edu/luc\\_diss/192](http://ecommons.luc.edu/luc_diss/192)
- Cimadevilla, J. M., Kaminsky, Y., Fenton, A., Bures, J., 2000. Passive and active place avoidance as a tool of spatial memory research in rats. *J Neurosci Methods*, 102, 155–64.
- Coon, H., Myles-Worsley, M., Tiobech, J., Hoff, M., Rosenthal, J., Bennett, P., Reimherr, F., Wender, P., Dale, P., Polloi, A., Byerley, W., 1998. Evidence for a chromosome 2p13-14 schizophrenia susceptibility locus in families from Palau, Micronesia. *Mol Psychiatry.* 3(6):521-7.
- Covault, J., Lee, J., Jensen, K., Kranzler, H., 2004. Nogo 3'-untranslated region CAA insertion: failure to replicate association with schizophrenia and demonstration of marked population difference in frequency of the insertion. *Molecular Brain Research* 120, 197–200.

- David, S., Aguayo, A. J., 1981. Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science*, 214(4523), 931-933.
- Davis, K. L., Stewart, D. G., Friedman, J. I., Buchsbaum, M., Harvey, P. D., Hof, P. R., Buxbaum, J., Haroutunian, V., 2003. White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Arch Gen Psychiatry* 60: 443–456.
- De Hoz, L., Moser, E. I., Morris, R. G., 2005. Spatial learning with unilateral and bilateral hippocampal networks. *European Journal of Neuroscience*, 22(3), 745-754.
- 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.
- Di Scala, F., Dupuis, L., Gaiddon, C., De Tapia, M., Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J. L., Raul, J. S., Ludes, B., Loeffler, J. P., 2005. Tissue specificity and regulation of the N-terminal diversity of reticulon 3. *Biochem J*. 385:125-134.
- Dickendesher, T. L., Baldwin, K. T., Mironova, Y. A., Koriyama, Y., Raiker, S. J., Askew, K. L., Wood, A., Geoffroy, C. G., Zheng, B., Liepmann, C. D., Katagiri, Y., Benowitz, L. I., Geller, H. M., Giger, R. J., 2012. NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nat Neurosci*. 15(5):703-12. doi: 10.1038/nn.3070.
- Diekmann, H., Klinger, M., Oertle, T., Heinz, D., Pogoda, H. M., Schwab, M. E., Stuermer, C. A., 2005. Analysis of the reticulon gene family demonstrates the absence of the neurite growth inhibitor Nogo-A in fish. *Mol Biol Evol*. 22, 1635–1648.
- Dimou, L., Schnell, L., Montani, L., Duncan, C., Simonen, M., Schneider, R., Liebscher, T., Gullo, M., Schwab, M. E., 2006. Nogo-A-deficient mice reveal strain-dependent differences in axonal regeneration. *The Journal of neuroscience*, 26(21), 5591-5603.
- Djurisic, M., Vidal, G. S., Mann, M., Aharon, A., Kim, T., Santos, A. F., Zuo, Y., Hubener, M., Shatz, C. J., 2013. PirB regulates a structural substrate for cortical plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20771-20776.
- Dodd, D. A., Niederoest, B., Bloechlinger, S., Dupuis, L., Loeffler, J. P., Schwab, M. E., 2005. Nogo-A,-B, and-C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12494-12502.
- Dubreuil, C. I., Winton, M. J., McKerracher, L., 2003. Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol*. 162:233–243.
- Duffy, P., Wang, X., Siegel, C. S., Tu, N., Henkemeyer, M., Cafferty, W. B., Strittmatter, S. M., 2012. Myelin-derived ephrinB3 restricts axonal regeneration and recovery after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(13):5063-8. doi: 10.1073/pnas.1113953109.
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J. L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Pradat, P. F., Lacomblez, L., Seihlan, D., Prinjha, R., Walsh, F. S., Meininger, V., Loeffler, J. P., 2002. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease*, 10(3), 358-365.
- Emerick, A. J., Neafsey, E. J., Schwab, M. E., Kartje, G. L., 2003. Functional reorganization of the motor cortex in adult rats after cortical lesion and treatment with monoclonal antibody IN-1. *J. Neurosci.*, 23(12), 4826-4830.
- Enkel, T., Berger, S. M., Schönig, K., Tews, B., Bartsch, D., 2014. Reduced expression of nogo-a leads to motivational deficits in rats. *Front Behav Neurosci*. 8:10. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00010. eCollection 2014.

- Eslamboli, A., Grundy, R. I., Irving, E. A., 2006. Time-dependent increase in Nogo-A expression after focal cerebral ischemia in marmoset monkeys. *Neurosci Lett.* 408(2):89-93.
- Fallin, M. D., Belmonte, P., Lassetter, V. K., Cheng, N., Avramopoulos, D., Mulle, J., Wolyniec, P. S., McGrath, J. A., Nestadt, G., Liang, K. Y., Valle, D., Pulver, A. E., 2006. Examination of sex and age of onset as important sources of variation for genetic association findings in schizophrenia. Abstract #2076, 2006 ASHG Meeting.
- Fehlings, M. G., Theodore, N., Harrop, J., Maurais, G., Kuntz, C., Shaffrey, C. I., Kwon, B. K., Chapman, J., Yee, A., Tighe, A., McKerracher, L., 2011. A phase I/IIa clinical trial of a recombinant Rho protein antagonist in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2011 28(5):787-96. doi: 10.1089/neu.2011.1765.
- Ferretti, P., Zhang, F., O'Neill, P., 2003. Changes in spinal cord regenerative ability through phylogenesis and development: lessons to be learnt. *Dev Dyn.* 226(2):245-56.
- Fiedler, M., Horn, C., Bandtlow, C., Schwab, M. E., Skerra, A., 2002. An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein Eng.* 15(11):931-41.
- Fontoura, P., Ho, P. P., DeVoss, J., Zheng, B., Lee, B. J., Kidd, B. A., Garren, H., Sobel, R. A., Robinson, W. H., Tessier-Lavigne, M., Steinman, L., 2004. Immunity to the extracellular domain of Nogo-A modulates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1,173(11):6981-92.
- Forstner, A. J., Degenhardt, F., Schratz, G., Nöthen, M. M., 2013. MicroRNAs as the cause of schizophrenia in 22q11.2 deletion carriers, and possible implications for idiopathic disease: a mini-review. *Front Mol Neurosci.* 6:47.
- 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., GrandPre, T., Strittmatter, S. M., 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature,* 409(6818), 341-346.
- 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.
- Fournier, A. E., Takizawa, B. T., Strittmatter, S. M., 2003. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *The Journal of Neuroscience,* 23(4):1416-23.
- Freund, P., Schmidlin, E., Wannier, T., Bloch, J., Mir, A., Schwab, M. E., Rouiller, E. M., 2006. Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nature Medicine,* 12(7), 790-792.
- Freund, P., Schmidlin, E., Wannier, T., Bloch, J., Mir, A., Schwab, M. E., Rouiller, E. M., 2009. Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates—re-examination and extension of behavioral data. *European Journal of Neuroscience,* 29(5), 983-996.
- Fujita, Y., Endo, S., Takai, T., Yamashita, T., 2011. Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *EMBO J* 30:1389–1401
- Gao, L., Utsumi, T., Tashiro, K., Liu, B., Zhang, D., Swenson, E. S., Iwakiri, Y., 2013. Reticulon 4B (Nogo-B) facilitates hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice. *Hepatology.* 57(5):1992-2003. doi: 10.1002/hep.26235.

- Gil, V., Nicolas, O., Mingorance, A., Urena, J. M., Tang, B. L., Hirata, T., Saez-Valero, J., Ferrer, I., Soriano, E., del Rio, J. A., 2006. Nogo-A expression in the human hippocampus in normal aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65(5):433-44.
- Gillani, R. L., Tsai, S. Y., Wallace, D. G., O'Brien, T. E., Arhebamen, E., Tole, M., Schwab, M. E., Kartje, G. L., 2010. Cognitive recovery in the aged rat after stroke and anti-Nogo-A immunotherapy. *Behav Brain Res,* 208(2), 415-424.
- Goldman-Rakic, P. S., 1995. More clues on "latent" schizophrenia point to developmental origins. *Am J Psychiatry,* 152(12):1701-3.
- Goldstein, L. B., 1993. Rapid reliable measurement of lesion parameters for studies of motor recovery after sensorimotor cortex injury in the rat. *J Neurosci Methods* 48, 35–42.
- Gou, X., Zhang, Q., Xu, N., Deng, B., Wang, H., Xu, L., Wang, Q., 2013. Spatio-temporal expression of paired immunoglobulin-like receptor-B in the adult mouse brain after focal cerebral ischaemia. *Brain Injury,* 27(11), 1311-1315.
- 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.
- GrandPré, T., Li, S., Strittmatter, S. M., 2002. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417:547-551.
- Gregorio, S.P., Mury, F.B., Ojopi, E.B., Sallet, P.C., Moreno, D.H., Yacubian, J., Tavares, H., Santos, F. R., Gattaz, W. F., Dias-Neto, E., 2005. Nogo CAA 30UTR Insertion polymorphism is not associated with Schizophrenia nor with bipolar disorder. *Schizophrenia Research* 75, 5–9.
- Grunewald, E., Kinnell, H. L., Porteous, D. J., Thomson, P. A., 2009. GPR50 interacts with neuronal NOGO-A and affects neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 363–371.
- Guo, F., Wang, H., Li, L., Zhou, H., Wei, H., Jin, W., Wang, Q., Xiong, L., 2013a. A novel domain of amino-Nogo-A protects HT22 cells exposed to oxygen glucose deprivation by inhibiting NADPH oxidase activity. *Cell Mol Neurobiol.* 33(3):443-52. doi: 10.1007/s10571-013-9911-1.
- Guo, F., Jin, W. L., Li, L. Y., Song, W. Y., Wang, H. W., Gou, X. C., Mi, Y. J., Wang, Q., Xiong, L., 2013b. M9, a novel region of amino-Nogo-A, attenuates cerebral ischemic injury by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in mice. *CNS Neurosci Ther.* 19(5):319-28. doi: 10.1111/cns.12083.
- Hånell, A., Clausen, F., Björk, M., Jansson, K., Philipson, O., Nilsson, L. N., Hillered, L., Weinreb, P. H., Lee, D., McIntosh, T. K., Gimbel, D. A., Strittmatter, S. M., Marklund, N., 2010. Genetic deletion and pharmacological inhibition of Nogo-66 receptor impairs cognitive outcome after traumatic brain injury in mice. *Journal of neurotrauma,* 27(7), 1297-1309.
- Haroutunian, V., Davis, K. L., 2007. Introduction to the special section: Myelin and oligodendrocyte abnormalities in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 10(4):499-502.
- Harrington, A. W., Li, Q. M., Tep, C., Park, J. B., He, Z., Yoon, S. O., 2008. The role of Kalirin9 in p75/nogo receptormediated RhoA activation in cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.* 283, 24690–24697.
- Harrison, K. D., Miao, R. Q., Fernandez-Hernando, C., Suarez, Y., Davalos, A., Sessa, W. C., 2009. Nogo-B receptor stabilizes Niemann–Pick type C2 protein and regulates intracellular cholesterol trafficking. *Cell Metab.* 10, 208–218.

- Hata, K., Fujitani, M., Yasuda, Y., Doya, H., Saito, T., Yamagishi, S., Mueller, B. K., Yamashita, T., 2006. RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *J Cell Biol* 173:47–58.
- Hauben, E., Ibarra, A., Mizrahi, T., Barouch, R., Agranov, E., Schwartz, M., 2001. Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal cord injury promotes recovery via a T-cell-mediated neuroprotective response: comparison with other myelin antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15173.
- 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.
- He, W., Lu, Y., Qahwash, I., Hu, X. Y., Chang, A., Yan, R., 2004. Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation. *Nat Med*. 10(9):959-65.
- He, X. L., Bazan, J. F., McDermott, G., Park, J. B., Wang, K., Tessier-Lavigne, M., He, Z., Garcia, K. C., 2003. Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron*. 38(2):177-85.
- Hodos, W., 1961. Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 134, 943–944. doi:10.1126/science.134.3483.943
- Hodos, W., Kalman, G., 1963. Effects of increment size and reinforcer volume on progressive ratio performance. *J. Exp. Anal. Behav.* 6, 387–392. doi:10.1901/jeab.1963.6-387
- Hsu, R., Woodroffe, A., Lai, W. S., Cook, M. N., Mukai, J., Dunning, J. P., Swanson, D. J., Roos, J. L., Abecasis, G. R., Karayiorgou, M., Gogos, J. A., 2007. Nogo Receptor 1 (RTN4R) as a candidate gene for schizophrenia: analysis using human and mouse genetic approaches. *PloS one*, 2(11), e1234.
- Hu, F., Liu, B. P., Budel, S., Liao, J., Chin, J., Fournier, A., Strittmatter, S. M., 2005. Nogo-A interacts with the Nogo-66 receptor through multiple sites to create an isoform-selective subnanomolar agonist. *The Journal of neuroscience*, 25(22), 5298-5304.
- Hu, F., Strittmatter, S. M., 2008. The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism. *J Neurosci* 28(5):1262–1269
- Hu, X., Shi, Q., Zhou, X., He, W., Yi, H., Yin, X., Gearing, M., Levey, A., Yan, R., 2007. Transgenic mice overexpressing reticulon 3 develop neuritic abnormalities. *EMBO J*. 26(11):2755-67.
- Huang, D. W., L. McKerracher, P. E. Braun, S. David., 1999. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 34:639.
- Huber, A. B., Weinmann, O., Brösamle, C., Oertle, T., Schwab, M. E., 2002. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *The Journal of neuroscience*, 22(9), 3553-3567.
- Huebner, E. A., Kim, B. G., Duffy, P. J., Brown, R. H., Strittmatter, S. M., 2011. A multi-domain fragment of Nogo-A protein is a potent inhibitor of cortical axon regeneration via Nogo receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 18026-18036.
- Hunt, D., Coffin, R. S., Prinjha, R. K., Campbell, G., Anderson, P. N., 2003. Nogo-A expression in the intact and injured nervous system. *Mol Cell Neurosci*. 24(4):1083-102.
- Cheatwood, J. L., Emerick, A. J., Schwab, M. E., Kartje, G. L., 2008. Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat. *Stroke*. 39(7):2091-8. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.507426.

- Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F., Schwab, M. E., 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, 403(6768), 434-439.
- Chen, Y., Tang, X., Cao, X., Chen, H., Zhang, X., 2006. Human Nogo-C overexpression induces HEK293 cell apoptosis via a mechanism that involves JNK-c-Jun pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 348:923–928.
- Chen, W., Gu, N., Duan, S., Sun, Y., Zheng, Y., Li, C., Pan, Y., Xu, Y., Feng, G., He, L., 2004. No association between the genetic polymorphisms within RTN4 and schizophrenia in the Chinese population. *Neuroscience Letters* 365, 23–27.
- Chivatakarn, O., Kaneko, S., He, Z., Tessier-Lavigne, M., Giger, R. J., 2007. The Nogo-66 receptor NgR1 is required only for the acute growth cone-collapsing but not the chronic growth-inhibitory actions of myelin inhibitors. *J Neurosci.* 27(27):7117-24.
- Chong, S. Y., Rosenberg, S. S., Fancy, S. P., Zhao, C., Shen, Y. A., Hahn, A. T., McGee, A. W., Xu, X., Zheng, B., Zhang, L. I., Rowitch, D. H., Franklin, R. J., Lu, Q. R., Chan, J. R., 2012. Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(4):1299-304. doi: 10.1073/pnas.1113540109.
- Inoue, H., Lin, L., Lee, X., Shao, Z., Mendes, S., Snodgrass-Belt, P., Sweigard, H., Engber, T., Pepinsky, B., Yang, L., Beal, M. F., Mi, S., Isacson, O., 2007. Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104(36), 14430-14435.
- Iwahashi, J., Hamada, N., 2003. Human reticulon 1-A and 1-B interact with a medium chain of the AP-2 adaptor complex. *Cellular and molecular biology*, 49, OL467-71.
- Ji, B., Li, M., Wu, W. T., Yick, L. W., Lee, X., Shao, Z., Wang, J., So, K. F., McCoy, J. M., Pepinsky, R. B., Mi, S., Relton, J. K., 2006. LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 33(3), 311-320.
- Jiang, W., Xia, F., Han, J., Wang, J., 2009. Patterns of Nogo-A, NgR, and RhoA expression in the brain tissues of rats with focal cerebral infarction. *Transl Res* 154:40–48.
- Jitoku, D., Hattori, E., Iwayama, Y., Yamada, K., Toyota, T., Kikuchi, M., Maekawa, M., Nishikawa, T., Yoshikawa, T., 2011. Association study of Nogo-related genes with schizophrenia in a Japanese case-control sample. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 156(5), 581-592.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J. L., Pradat, P. F., Dupuis, L., Echaniz-Laguna, A., Muller, A., Dubourg, O., Seilhean, D., Hauw, J. J., Loeffler, J. P., Meininger, V., 2005. Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol.* 57(4):553-6.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J. L., Dimou, L., Lin, S., Fergani, A., Ruegg, M. A., Schwab, M. E., Dupuis, L., Loeffler, J. P., 2006. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep.* 7(11):1162-7.
- Jones, C. A., Watson, D. J., Fone, K. C. (2011). Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 164(4):1162-94. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x.
- Josephson, A., Widenfalk, J., Widmer, H. W., Olson, L., Spenger, C., 2001. NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Experimental neurology*, 169(2), 319-328.



- Josephson, A., Trifunovski, A., Schéele, C., Widenfalk, J., Wahlestedt, C., Brené, S., Olson, L., Spenger, C., 2003. Activity-induced and developmental downregulation of the Nogo receptor. *Cell and tissue research*, 311(3), 333-342.
- Joset, A., Dodd, D. A., Halegoua, S., Schwab, M. E., 2010. Pincher-generated Nogo-A endosomes mediate growth cone collapse and retrograde signaling. *J Cell Biol.* 188(2):271-85. doi: 10.1083/jcb.200906089.
- Jurewicz, A., Matysiak, M., Raine, C. S., Selmaj, K., 2007. Soluble Nogo-A, an inhibitor of axonal regeneration, as a biomarker for multiple sclerosis. *Neurology.* 68(4):283-7.
- Karayorgou, M., Morris, M. A., Morrow, B., Shprintzen, R. J., Goldberg, R., Borrow, J., Gos, A., Nestadt, G., Wolyniec, P. S., Lasseter, V. K., Eisen, H., Childs, B., Kazazian, H. H., Kucherlapati, R., Antonarakis, S. E., Pulver, A. E., Housman, D. E., 1995. Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11.2. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7612–7616.
- Karlén, A., Karlsson, T. E., Mattsson, A., Lundströmer, K., Codeluppi, S., Pham, T. M., Bäckman, C. M., Ogren, S. O., Aberg, E., Hoffman, A.F., Sherling, M. A., Lupica, C.R., Hoffer, B. J., Spenger, C., Josephson, A., Brené, S. Olson, L., 2009. Nogo receptor 1 regulates formation of lasting memories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106, 20476-81. doi: 10.1073/pnas.0905390106.
- Karnezis, T., Mandemakers, W., McQualter, J. L., Zheng, B., Ho, P. P., Jordan, K. A., Murray, B. M., Barres, B., Tessier-Lavigne, M., Bernard, C. C., 2004. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nature Neurosci.* 7:736–744.
- Kempf, A., Montani, L., Petrinovic, M. M., Schroeter, A., Weinmann, O., Patrignani, A., Schwab, M. E., 2013. Upregulation of axon guidance molecules in the adult central nervous system of Nogo-A knockout mice restricts neuronal growth and regeneration. *European Journal of Neuroscience*, 38(11), 3567-3579.
- Kempf, A., Tews, B., Arzt, M. E., Weinmann, O., Obermair, F. J., Pernet, V., Zagrebelsky, M., Delekate, A., Iobbi, C., Zemmar, A., Ristic, Z., Gullo, M., Spies, P., Dodd, D., Gyax, D., Korte, M., Schwab, M. E., 2014. The Sphingolipid Receptor S1PR2 Is a Receptor for Nogo-A Repressing Synaptic Plasticity. *PLoS biology*, 12(1), e1001763.
- Kilic, E., ElAli, A., Kilic, Ü., Guo, Z., Ugur, M., Uslu, U., Bassetti, C. L., Schwab, M. E., Hermann, D. M., 2010. Role of Nogo-A in neuronal survival in the reperfused ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(5), 969-984.
- Kim, J. E., Bonilla, I. E., Qiu, D., Strittmatter, S. M., 2003a. Nogo-C is sufficient to delay nerve regeneration. *Mol Cell Neurosci.* 23(3):451-9.
- Kim, J. E., Li, S., GrandPré, T., Qiu, D., Strittmatter, S. M., 2003b. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron*, 38(2), 187-199.
- Kim, J. E., Liu, B. P., Park, J. H., Strittmatter, S. M., 2004. Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron*, 44(3), 439-451.
- Kimble, D. P., Kimble, R. J., 1965. Hippocampectomy and response perseveration in the rat. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 60(3), 474.
- Kirkpatrick, B., Messias, E., Harvey, P. D., Fernandez-Egea, E., Bowie, C. R., 2008. Is schizophrenia a syndrome of accelerated aging?. *Schizophrenia bulletin*, 34(6), 1024-1032.

- Kiseleva, E., Morozova, K. N., Voeltz, G. K., Allen, T. D., Goldberg, M. W., 2007. Reticulon 4a/NogoA locates to regions of high membrane curvature and may have a role in nuclear envelope growth. *J. Struct. Biol.* 160, 224–235.
- Klinger, M., Taylor, J. S., Oertle, T., Schwab, M. E., Stuermer, C. A., Diekmann, H., 2004a. Identification of Nogo-66 receptor (NgR) and homologous genes in fish. *Mol Biol Evol.* 21(1):76-85.
- Klinger, M., Diekmann, H., Heinz, D., Hirsch, C., Hannbeck von Hanwehr, S., Petrasch, B., Oertle, T., Schwab, M. E., Stuermer, C. A., 2004b. Identification of two NOGO/RTN4 genes and analysis of Nogo-A expression in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Neurosci.* 25(2):205-16.
- Kondo, Y., Jadowiec, C. C., Muto, A., Yi, T., Protack, C., Collins, M. J., Tellides, G., Sessa, W. C., Dardik, A., 2013. The Nogo-B-PirB axis controls macrophage-mediated vascular remodeling. *PloS one*, 8(11), e81019.
- Křištofiková, Z., Vrajobá, M., Sirová, 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.* 7:90.
- Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C. M., Kalled, S. L., Hess, D. M., Serafini, B., Aloisi, F., Wekerle, H., Hohlfeld, R., Meinl, E., 2005. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med.* 201(2):195-200.
- Kubík, Š., Fenton, A. A., 2005. Behavioral evidence that segregation and representation are dissociable hippocampal functions. *The Journal of neuroscience*, 25(40), 9205-9212.
- Laurén, J., Hu, F., Chin, J., Liao, J., Airaksinen, M. S., Strittmatter, S. M., 2007. Characterization of myelin ligand complexes with neuronal Nogo-66 receptor family members. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5715-5725.
- Lazar, N. L., Singh, S., Paton, T., Clapcote, S. J., Gondo, Y., Fukumura, R., Roder, J. C., Cain, D. P., 2011. Missense mutation of the reticulon-4 receptor alters spatial memory and social interaction in mice. *Behav Brain Res.* 224:73–79.
- Lecourtier, L., Antal, M. C., Cosquer, B., Schumacher, A., Samama, B., Angst, M. J., Ferrandon, A., Koning, E., Cassel, J. C., Nehlig, A., 2012. Intact neurobehavioral development and dramatic impairments of procedural-like memory following neonatal ventral hippocampal lesion in rats. *Neuroscience*, 207, 110-123. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.01.040
- Lee, H., Raiker, S. J., Venkatesh, K., Geary, R., Robak, L. A., Zhang, Y., Yeh, H. H., Shrager, P., Giger, R. J., 2008. Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *J Neurosci.* 28:2753–2765.
- 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.
- Lee, J.K., Kim, J.E., Sivula, M., and Strittmatter, S.M., 2004. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J. Neurosci.* 24, 6209–6217.
- Lee, J. K., Chan, A. F., Luu, S. M., Zhu, Y., Ho, C., Tessier-Lavigne, M., Zheng, B., 2009. Reassessment of corticospinal tract regeneration in Nogo-deficient mice. *The Journal of Neuroscience*, 29(27), 8649-8654.

- Lee, J. K., Geoffroy, C. G., Chan, A. F., Tolentino, K. E., Crawford, M. J., Leal, M. A., Kang, B., Zheng, B., 2010. Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron*, 66(5), 663-670.
- Lee, J. K., Zheng, B., 2012. Role of myelin-associated inhibitors in axonal repair after spinal cord injury. *Experimental neurology*, 235(1), 33-42.
- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., McKerracher, L., 1999. Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci*. 19(17):7537-47.
- Lenzlinger, P. M., Shimizu, S., Marklund, N., Thompson, H. J., Schwab, M. E., Saatman, K. E., Hoover, R. C., Bareyre, F. M., Motta, M., Luginbuhl, A., Pape, R., Clouse, A. K., Morganti-Kossmann, C., McIntosh, T. K., 2005. Delayed inhibition of Nogo-A does not alter injury-induced axonal sprouting but enhances recovery of cognitive function following experimental traumatic brain injury in rats. *Neuroscience*, 134(3), 1047-1056.
- Le Pen, G., Gaudet, L., Mortas, P., Mory, R., Moreau, J. L., 2002. Deficits in reward sensitivity in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 161(4), 434-41.
- Lewis, D. A., Levitt, P., 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci*. 25:409-32.
- Li, Q., Qi, B., Oka, K., Shimakage, M., Yoshioka, N., Inoue, H., Hakura, A., Kodama, K., Stanbridge, E. J., Yutsudo, M., 2001. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. *Oncogene* 20, 3929–3936.
- Li, S., Strittmatter, S. M., 2003. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience* 23(10), 4219-4227.
- Li, S., Liu, B. P., Budel, S., Li, M., Ji, B., Walus, L., Li, W., Jirik, A., Rabacchi, S., Choi, E., Worley, D., Sah, D. W., Pepinsky, B., Lee, D., Relton, J., Strittmatter, S. M., 2004. Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury. *J Neurosci*. 24(46):10511-20.
- Liebscher, T., Schnell, L., Schnell, D., Scholl, J., Schneider, R., Gullo, M., Fouad, K., Mir, A., Rausch, M., Kindler, D., Hamers, F. P., Schwab, M. E., 2005. Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord injured rats. *Ann Neurol*, 58:706-19.
- Lipska, B. K., Weinberger, D. R., 2000. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 23, 223e239.
- Liu, H., Abecasis, G. R., Heath, S. C., Knowles, A., Demars, S., Chen, Y., Louw Roos, J., Rapoport, J. L., Gogos, J. A., Karayiorgou, M., 2002. Genetic variation in the 22q11.2 locus and susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16859–16864.
- Liu, Y., Vidensky, S., Ruggiero, A. M., Maier, S., Sitte, H. H., Rothstein, J. D., 2008. Reticulon RTN2B regulates trafficking and function of neuronal glutamate transporter EAAC1. *J. Biol. Chem*. 283, 6561–6571.
- Liu, Y. Y., Jin, W. L., Liu, H. L., Ju, G., 2003. Electron microscopic localization of Nogo-A at the postsynaptic active zone of the rat. *Neuroscience letters*, 346(3), 153-156.
- Lobellova, V., Entlerova, M., Svojanovska, B., Hatalova, H., Prokopova, I., Petrsek, T., Vales, K., Kubik, S., Fajnerova, I., Stuchlik, 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. doi:10.1016/j.bbr.2013.03.006
- Lord-Fontaine, S., Yang, F., Diep, Q., Dergham, P., Munzer, S., Tremblay, P., McKerracher, L., 2008. Local inhibition of Rho signaling by cell-permeable recombinant protein BA-210 prevents secondary damage and promotes functional recovery following acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 25(11):1309-22. doi: 10.1089/neu.2008.0613.
- Löw, K., Culbertson, M., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M., Tuszynski, M. H., 2008. Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. *J Neurosci*. 28(5):1099-108. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4906-07.2008.
- Luo, Y., Wu, X., Liu, S., Li, K., 2011. Reactivation of visual cortical plasticity by NEP1-40 from early monocular deprivation in adult rats. *Neurosci Lett*. 494(3):196-201. doi: 10.1016/j.neulet.2011.03.011.
- Mannan, A. U., Boehm, J., Sauter, S. M., Rauber, A., Byrne, P. C., Neesen, J., Engel, W., 2006. Spastin, the most commonly mutated protein in hereditary spastic paraplegia interacts with Reticulon 1 an endoplasmic reticulum protein. *Neurogenetics*, 7:93-103.
- Markus, T. M., Tsai, S. Y., Bollnow, M. R., Farrer, R. G., O'Brien, T. E., Kindler-Baumann, D. R., Rausch, M., Rudin, M., Wiessner, C., Mir, A. K., Schwab, M. E., Kartje, G. L., 2005. Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats. *Ann Neurol*. 58(6):950-3.
- Marklund, N., Bareyre, F. M., Royo, N. C., Thompson, H. J., Mir, A. K., Grady, M. S., Schwab, M. E., McIntosh, T. K., 2007. Cognitive outcome following brain injury and treatment with an inhibitor of Nogo-A in association with an attenuated downregulation of hippocampal growth-associated protein-43 expression. *Journal of neurosurgery*, 107(4), 844.
- Marklund, N., Morales, D., Clausen, F., Hånell, A., Kiwanuka, O., Pitkänen, A., Gimbel, D.A., Philipson, O., Lannfelt, L., Hillered, L., Strittmatter, S. M., McIntosh, T. K., 2009. Functional outcome is impaired following traumatic brain injury in aging Nogo-A/B-deficient mice. *Neuroscience*, 163(2), 540-551.
- Masliyah, E., Xie, F., Dayan, S., Rockenstein, E., Mante, M., Adame, A., Patrick, C. M., Chan, A. F., Zheng, B., 2010. Genetic deletion of *Nogo/Rtn4* ameliorates behavioral and neuropathological outcomes in amyloid precursor protein transgenic mice. *Neuroscience*, 169(1), 488-494.
- 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.
- McGee, A. W., Yang, Y., Fischer, Q. S., Daw, N. W., Strittmatter, S. M., 2005. Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science* 309: 2222–2226.
- McKerracher, L., Anderson, K. D., 2013. Analysis of recruitment and outcomes in the phase I/IIa Cethrin clinical trial for acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 30(21):1795-804. doi: 10.1089/neu.2013.2909. Epub 2013 Oct 1.
- Meier, S., Bräuer, A. U., Heimrich, B., Schwab, M. E., Nitsch, R., Savaskan, N. E., 2003. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. *FASEB J*. 17(9):1153-5.
- Meng, J., Shi, Y., Zhao, X., Guo, S., Wang, H., Zheng, Y., Tang, R., Feng, G., Gu, N., Liu, H., Zhu, S., He, L., 2007. No association between the genetic polymorphisms in the RTN4R gene and schizophrenia in the Chinese population. *J Neural Transm* 114: 249–254.

- Merkler, D., Metz, G. A., Raineteau, O., Dietz, V., Schwab, M. E., Fouad, K., 2001. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J Neurosci.* 21(10):3665-73.
- Merkler, D., Oertle, T., Buss, A., Pinschewer, D. D., Schnell, L., Bareyre, F. M., Kerschensteiner, M., Buddeberg, B. S., Schwab, M. E., 2003. Rapid induction of autoantibodies against Nogo-A and MOG in the absence of an encephalitogenic T cell response: implication for immunotherapeutic approaches in neurological diseases. *FASEB J.* 17(15):2275-7.
- Mi, S., Hu, B., Hahm, K., Luo, Y., Kam Hui, E.S., Yuan, Q., Wong, W.M., Wang, L., Su, H., Chu, T.H., Guo, J., Zhang, W., So, K.F., Pepinsky, B., Shao, Z., Graff, C., Garber, E., Jung, V., Wu, E.X., Wu, W., 2007. LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 13(10), 1228- 1233.
- Mi, Y. J., Hou, B., Liao, Q. M., Ma, Y., Luo, Q., Dai, Y. K., Ju, G., Jin, W. L., 2012. Amino-Nogo-A antagonizes reactive oxygen species generation and protects immature primary cortical neurons from oxidative toxicity. *Cell Death & Differentiation*, 19(7), 1175-1186.
- Miao, R. Q., Gao, Y., Harrison, K. D., Prendergast, J., Acevedo, L. M., Yu, J., Hu, F., Strittmatter, S. M., Sessa, W. C., 2006. Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 10997–11002.
- Mingorance, A., Fontana, X., Solé, M., Burgaya, F., Ureña, J. M., Teng, F. Y., Tang, B. L., Hunt, D., Anderson. P. N., Bethea, J. R., Schwab, M. E., Soriano. E., del Río, J. A., 2004. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(1), 34-49.
- 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.
- Moreau-Fauvarque, C., Kumanogoh, A., Camand, E., Jaillard, C., Barbin, G., Boquet, I., Love, C., Jones, E. Y., Kikutani, H., Lubetzki, C., Dusart, I., Chédotal, A., 2003. The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *The Journal of Neuroscience*, 23(27):9229-39.
- 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.
- Murayama, K. S., Kametani, F., Saito, S., Kume, H., Akiyama, H., Araki, W., 2006. Reticulons RTN3 and RTN4-B/C interact with BACE1 and inhibit its ability to produce amyloid beta-protein. *Eur J Neurosci.* 24(5):1237-44.
- Nakamura, Y., Fujita, Y., Ueno, M., Takai, T., Yamashita, T., 2011. Paired immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regeneration or locomotor recovery after spinal cord injury. *Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 1876-1883.
- Nie, D. Y., Zhou, Z. H., Ang, B. T., Teng, F. Y., Xu, G., Xiang, T., Wang, C. Y., Zeng, L., Takeda, Y., Xu, T. L., Ng, Y. K., Faivre-Sarrailh, C., Popko, B., Ling, E. A., Schachner, M., Watanabe, K., Pallen, C. J., Tang, B. L., Xiao, Z. C., 2003. Nogo-A at CNS paranodes is a ligand of Caspr: possible regulation of K<sup>+</sup> channel localization. *The EMBO journal*, 22(21), 5666-5678.

- Niederöst, B. P., Zimmermann, D. R., Schwab, M. E., Bandtlow, C. E., 1999. Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *The Journal of Neuroscience*, 19(20):8979-89.
- Niederöst, B., Oertle, T., Fritsche, J., McKinney, R. A., Bandtlow, C. E., 2002. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *The journal of neuroscience*, 22(23), 10368-10376.
- Novak, G., Kim, D., Seeman, P., Talerico, T., 2002. Schizophrenia and Nogo: elevated mRNA in cortex, and high prevalence of a homozygous CAA insert. *Molecular Brain Research*, 107(2), 183-189.
- Novak, G., Talerico, T., 2006. Nogo A, B and C expression in schizophrenia, depression and bipolar frontal cortex, and correlation of Nogo expression with CAA/TATC polymorphism in 3'-UTR. *Brain research*, 1120(1), 161-171.
- 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.
- Oertle, T., Klinger, M., Stuermer, C. A. O., Schwab, M. E., 2003a. A reticular rhapsody: phylogenetic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. *FASEB J.* 17, 1238-1247.
- Oertle, T., Huber, C., van der Putten, H., Schwab, M. E., 2003b. Genomic structure and functional characterisation of the promoters of human and mouse Nogo/Rtn-4. *J. Mol. Biol.* 325, 299-323.
- Oertle, T., van der Haar, M. E., Bandtlow, C. E., Robeva, A., Burfeind, P., Buss, A., Huber, A. B., Simonen, M., Schnell, L., Brösamle, C., Kaupmann, K., Vallon, R., Schwab, M. E., 2003c. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *The Journal of neuroscience*, 23(13), 5393-5406.
- Oertle, T., Merkler, D., Schwab, M. E., 2003d. Do cancer cells die because of Nogo-B? *Oncogene* 22, 1390-1399.
- Oertle, T., Schwab, M. E., 2003. Nogo and its paRTNers. *Trends in cell biology*, 13(4), 187-194.
- Omoto, S., Ueno, M., Mochio, S., Takai, T., Yamashita, T., 2010. Genetic deletion of paired immunoglobulin-like receptor B does not promote axonal plasticity or functional recovery after traumatic brain injury. *The Journal of Neuroscience*, 30(39), 13045-13052.
- O'Neill, P., Whalley, K., Ferretti, P., 2004. Nogo and Nogo-66 receptor in human and chick: implications for development and regeneration. *Dev Dyn*. 231(1):109-21.
- Papadopoulos, C. M., Tsai, S. Y., Alsbie, T., O'Brien, T. E., Schwab, M. E., Kartje, G. L., 2002. Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat. *Annals of neurology*, 51(4), 433-441.
- Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P. D., Wang, C., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Kramvis, I., Sahin, M., He, Z., 2008. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science*. 322(5903):963-6. doi: 10.1126/science.1161566.
- Park, J. B., Yiu, G., Kaneko, S., Wang, J., Chang, J., He, Z., 2005. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron*, 45(3), 345-351.

- Park, J. H., Gimbel, D. A., GrandPre, T., Lee, J. K., Kim, J. E., Li, W., Lee, D. H., Strittmatter, S. M., 2006a. Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid- $\beta$  plaque deposition. *J. Neurosci.* 26, 1386–1395.
- Park, J. H., Widi, G. A., Gimbel, D. A., Harel, N. Y., Lee, D. H., Strittmatter, S. M., 2006b. Subcutaneous Nogo receptor removes brain amyloid- $\beta$  and improves spatial memory in Alzheimer's transgenic mice. *J. Neurosci.* 26, 13279–13286.
- Park, J. H., Strittmatter, S. M., 2007. Nogo Receptor Interacts with Brain APP and A $\beta$  to Reduce Pathologic Changes in Alzheimer's Transgenic Mice. *Current Alzheimer research*, 4(5), 568.
- Pasaje, C. F., Bae, J. S., Park, B. L., Park, C. S., Kim, B. J., Lee, C. S., Kim, J. W., Choi, W. H., Shin, T. M., Koh, I. S., Choi, I. G., Woo, S. L., Shin, H. D., 2011. Lack of association of the RTN4R genetic variations with risk of schizophrenia and SPEM abnormality in a Korean population. *Psychiatry Res.* 189(2):312-4. doi: 10.1016/j.psychres.2011.02.006.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A., Sacktor, T. C., 2006. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*, 313, 1141–1144.
- Pelizza, L., Ferrari, A., 2009. Anhedonia in schizophrenia and major depression: state or trait? *Ann. Gen. Psychiatry* 8, 22. doi: 10.1186/1744-859X-8-22.
- Peng, X., Kim, J., Zhou, Z., Fink, D. J., Mata, M., 2011. Neuronal Nogo-A regulates glutamate receptor subunit expression in hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry*, 119(6), 1183-1193.
- 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.
- Pernet, V., Joly, S., Dalkara, D., Schwarz, O., Christ, F., Schaffer, D., Flannery, J. G., Schwab, M. E., 2012. Neuronal Nogo-A upregulation does not contribute to ER stress-associated apoptosis but participates in the regenerative response in the axotomized adult retina. *Cell Death Differ.* 19(7):1096-108. doi: 10.1038/cdd.2011.191.
- Pernet, V., Schwab, M. E., 2012. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell and tissue research*, 349(1), 97-104.
- Petrasek, 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. *Neurobiol Learn Mem.* 107:42-9.
- Petrasek, 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.* 8:90.
- Petrinovic, M. M., Duncan, C. S., Bourikas, D., Weinman, O., Montani, L., Schroeter, A., Maerki, D., Sommer, L., Stoeckli, E. T., Schwab, M. E., 2010. Neuronal Nogo-A regulates neurite fasciculation, branching and extension in the developing nervous system. *Development*, 137(15), 2539-2550.
- 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.

- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., Maffei, L., 2002. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 298(5596), 1248-1251.
- Pradat, P. F., Bruneteau, G., Gonzalez de Aguilar, J. L., Dupuis, L., Jokic, N., Salachas, F., Le Forestier, N., Echaniz-Laguna, A., Dubourg, O., Hauw, J. J., Tranchant, C., Loeffler, J. P., Meininger, V., 2007. Muscle Nogo-A expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann Neurol*. 62:15-20.
- Prinjha, R., Moore, S. E., Vinson, M., Blake, S., Morrow, R., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D. L., Walsh, F. S., 2000. Neurobiology: Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature*, 403(6768), 383-384.
- Prior, M., Shi, Q., Hu, X., He, W., Levey, A., Yan, R., 2010. RTN/Nogo in forming Alzheimer's neuritic plaques. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1201-1206.
- Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M., Wishaw, I. Q., 2002. Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behav Brain Res*, 136(2), 339-348.
- Qi, B., Qi, Y., Watari, A., Yoshioka, N., Inoue, H., Minemoto, Y., Yamashita, K., Sasagawa, T., Yutsudo, M., 2003. Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP. *J Cell Physiol*. 196(2):312-8.
- Qin, H., Pu, H. X., Li, M., Ahmed, S., Song, J., 2008. Identification and Structural Mechanism for a Novel Interaction between a Ubiquitin Ligase WWP1 and Nogo-A, a Key Inhibitor for Central Nervous System Regeneration. *Biochemistry*, 47(51), 13647-13658.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raiker, S. J., Lee, H., Baldwin, K. T., Duan, Y., Shrager, P., Giger, R. J., 2010. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity dependent synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2010, 30:12432-12445.
- Ramón y Cajal, S., 1928. In May, R. M. (ed.) *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Oxford Univ. Press, London, 1928.
- Reindl, M., Khantane, S., Ehling, R., Schanda, K., Lutterotti, A., Brinkhoff, C., Oertle, T., Schwab, M. E., Deisenhammer, F., Berger, T., Bandtlow, C. E., 2003. Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders. *J Neuroimmunol*. 145:139-147.
- Richard, M., Giannetti, N., Saucier, D., Sacquet, J., Jourdan, F., Pellier-Monnin, V., 2005. Neuronal expression of Nogo-A mRNA and protein during neurite outgrowth in the developing rat olfactory system. *Eur J Neurosci*. 22(9):2145-58.
- Richardson, P. M., McGuinness, U. M., Aguayo, A. J., 1980. Axons from CNS neurones regenerate into PNS grafts. *Nature*, 284 (5753): 264-265.
- Rolando, C., Parolisi, R., Boda, E., Schwab, M. E., Rossi, F., Buffo, A., 2012. Distinct roles of Nogo-a and Nogo receptor 1 in the homeostatic regulation of adult neural stem cell function and neuroblast migration. *The Journal of Neuroscience*, 32(49), 17788-17799.
- Sato, Y., Iketani, M., Kurihara, Y., Yamaguchi, M., Yamashita, N., Nakamura, F., Arie, Y., Kawasaki, T., Hirata, T., Abe, T., Kiyonari, H., Strittmatter, S. M., Goshima, Y., Takei, K., 2011. Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science*. 333(6043):769-73. doi: 10.1126/science.1204144.



- Serrano, P., Friedman, E. L., Kenney, J., Taubenfeld, S. M., Zimmerman, J. M., Hanna, J., Alberini, C., Kelley, A. E., Maren, S., Rudy, J. W., Yin, J. C., Sacktor, T. C., Fenton, A. A., 2008. PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biology*, 6, 2698–2706.
- Seymour, A. B., Andrews, E. M., Tsai, S. Y., Markus, T. M., Bollnow, M. R., Brenneman, M. M., O'Brien, T. E., Castro, A. J., Schwab, M. E., Kartje, G. L., 2005. Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25(10), 1366-1375.
- Shaw, S. H., Kelly, M., Smith, A. B., Shields, G., Hopkins, P. J., Loftus, J., Laval, S. H., Vita, A., De Hert, M., Cardon, L. R., Crow, T. J., Sherrington, R., DeLisi, L. E., 1998. A genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Am J Med Genet*. 81(5):364-76.
- Shi, Q., Prior, M., He, W., Tang, X., Hu, X., Yan, R., 2009a. Reduced amyloid deposition in mice overexpressing RTN3 is adversely affected by preformed dystrophic neurites. *The Journal of Neuroscience*, 29(29), 9163-9173.
- Shi, Q., Hu, X., Prior, M., Yan, R., 2009b. The occurrence of aging-dependent reticulon 3 immunoreactive dystrophic neurites decreases cognitive function. *J Neurosci*. 29:5108–5115.
- Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nature genetics*, 43(10), 969-976.
- Schmandke, A., Schmandke, A., Schwab, M. E., 2014. Nogo-A Multiple Roles in CNS Development, Maintenance, and Disease. *The Neuroscientist*, 20(4):372-386.
- Schnell, L., Schwab, M. E., 1990. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343, 269-272, doi:10.1038/343269a0
- Schwab, M. E., 2004. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 14(1):118-24.
- Schwab, M. E., 2010. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(12), 799-811.
- Schwab, M. E., Thoenen, H., 1985. Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci*. 5(9): 2415-23.
- 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.
- Schwab, M. E., Strittmatter, S. M., 2014. Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. *Curr Opin Neurobiol*. 27C:53-60. doi: 10.1016/j.conb.2014.02.011.
- Schweigreiter, R., 2008. The natural history of the myelin derived nerve growth inhibitor Nogo-A. *Neuron Glia Biol*. 4, 83–89.
- Simonen, M., Pedersen, V., Weinmann, O., Schnell, L., Buss, A., Ledermann, B., Christ F, Sansig G, van der Putten H, Schwab, M. E., 2003. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron*, 38(2), 201-211.
- Sinibaldi, L., De Luca, A., Bellacchio, E., Conti, E., Pasini, A., Paloscia, C., Spalletta, G., Caltagirone, C., Pizzuti, A., Dallapiccola, B., 2004. Mutations of the Nogo-66 receptor (RTN4R) gene in schizophrenia. *Hum Mutat*. 24, 534–535.

- 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.
- Steiner, P., Kulangara, K., Sarria, J.C., Glauser, L., Regazzi, R., Hirling, H., 2004. Reticulon 1-C/neuroendocrine-specific protein-C interacts with SNARE proteins. *J. Neurochem.* 89, 569–580.
- Steward, O., Zheng, B., Banos, K., Yee, K. M., 2007. Response to: Kim et al., "axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B." *Neuron* 38, 187-199. *Neuron*. 54(2):191-5.
- Steward, O., Sharp, K., Yee, K. M., Hofstadter, M., 2008. A re-assessment of the effects of a Nogo-66 receptor antagonist on regenerative growth of axons and locomotor recovery after spinal cord injury in mice. *Exp Neurol.* 209(2):446-68. doi:10.1016/j.expneurol.2007.12.010.
- Straub, R. E., MacLean, C. J., Ma, Y., Webb, B. T., Myakishev, M. V., Harris-Kerr, C., Wormley, B., Sadek, H., Kadambi, B., O'Neill, F. A., Walsh, D., Kendler, K. S., 2002. Genome-wide scans of three independent sets of 90 Irish multiplex schizophrenia families and follow-up of selected regions in all families provides evidence for multiple susceptibility genes. *Mol Psychiatry.* 7(6):542-59.
- Stuchlik, A., 2014. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front Behav Neurosci.* 8:106. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00106.
- Stuchlik, A., Fenton, A. A., Bures, J., 2001. Substratal idiothetic navigation of rats is impaired by removal or devaluation of extramaze and intramaze cues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3537–42.
- Stuchlik, A., Rezacova, L., Vales, K., Bubenikova, V., Kubik, S., 2004. Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci. Lett.* 366(2), 162-6.
- Swerdlow, N. R., Light, G. A., Breier, M. R., Shoemaker, J. M., Saint Marie, R. L., Neary, A. C., Geyer, M. A., Stevens, K. E., Powell, S. B., 2012. Sensory and sensorimotor gating deficits after neonatal ventral hippocampal lesions in rats. *Developmental neuroscience*, 34(2-3), 240-249.
- Syken, J., GrandPre, T., Kanold, P. O., Shatz, C. J., 2006. PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science*, 313(5794), 1795-1800.
- Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M., Tsujimoto, Y., 2000. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* 19, 5736–5746.
- Takahashi, N., Sakurai, T., Davis, K. L., Buxbaum, J. D., 2011. Linking oligodendrocyte and myelin dysfunction to neurocircuitry abnormalities in schizophrenia. *Progress in neurobiology*, 93(1), 13-24.
- Takei, Y., 2009. Phosphorylation of Nogo receptors suppresses Nogo signaling, allowing neurite regeneration. *Sci. Signal* 2, ra14.
- Taketomi, M., Kinoshita, N., Kimura, K., Kitada, M., Noda, T., Asou, H., Nakamura, T., Ide, C., 2002. Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules. *Neurosci Lett.* 332(1):37-40.
- Tan, E. C., Chong, S. A., Wang, H., Chew-Ping Lim, E., Teo, Y. Y., 2005. Gender-specific association of insertion/deletion polymorphisms in the *nogo* gene and chronic schizophrenia. *Molecular brain research*, 139(2), 212-216.

- Teng, F. Y., Tang, B. L., 2005. Why do Nogo/Nogo-66 receptor gene knockouts result in inferior regeneration compared to treatment with neutralizing agents? *J Neurochem* 94:865–874.
- Teng, F. Y., Tang, B. L. 2008. Cell autonomous function of Nogo and reticulons: The emerging story at the endoplasmic reticulum. *J Cell Physiol.* 216(2):303-8. doi: 10.1002/jcp.21434.
- Teng, F. Y., Tang, B. L., 2013. Nogo/RTN4 isoforms and RTN3 expression protect SH-SY5Y cells against multiple death insults. *Mol Cell Biochem.* 384(1-2):7-19. doi: 10.1007/s11010-013-1776-6.
- Tews, B., Schönig, K., Arzt, M.E., Schneider, M., Berger, S., Willi, R., Clementi, S., Starkey, M.L., Kempf, A., Schwab, M.E., Bartsch, D., 2010. Transgenic Nogo-A deficient rats exhibit similar psychiatric endophenotypes as described for Nogo-A KO mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* 36, 62.12.
- 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.
- Thallmair, M., Metz, G. A., Z'Graggen, W. J., Raineteau, O., Kartje, G. L., Schwab, M. E., 1998. Neurite growth inhibitors restrict structural plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nature Neurosci.* 1, 124-131.
- Theotokis, P., Loubopoulos, A., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Kofidou, E., Nousiopolou, E., Poulatsidou, K. N., Kesidou, E., Tascos, N., Spandou, E., Grigoriadis, N., 2012. Time course and spatial profile of Nogo-A expression in experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71(10):907-20.
- Thomas, R., Favell, K., Morante-Redolat, J., Pool, M., Kent, C., Wright, M., Daignault, K., Ferraro, G. B., Montcalm, S., Durocher, Y., Fournier, A., Perez-Tur, J., Barker, P. A., 2010. LGI1 is a Nogo receptor 1 ligand that antagonizes myelin-based growth inhibition. *J Neurosci.* 30(19):6607-12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5147-09.2010.
- Tombaugh, G. C., Rowe, W. B., Chow, A. R., Michael, T. H., Rose, G. M., 2002. Theta-frequency synaptic potentiation in CA1 in vitro distinguishes cognitively impaired from unimpaired aged Fischer 344 rats. *J Neurosci.* 22:9932-40.
- Tsai, S. Y., Papadopoulos, C. M., Schwab, M. E., Kartje, G. L., 2011. Delayed anti-nogo-a therapy improves function after chronic stroke in adult rats. *Stroke*, 42(1), 186-190.
- Vales, K., Bubenikova-Valesova, V., Klement, D., Stuchlik, A., 2006. Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats. *Neurosci. Res.* 55, 383–388. doi:10.1016/j.neures.2006.04.007
- VanGuilder, H. D., Yan, H., Farley, J. A., Sonntag, W. E., Freeman, W. M., 2010. Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *J Neurochem.* 113:1577-88.
- VanGuilder, H. D., Farley, J. A., Yan, H., Van Kirk, C. A., Mitschelen, M., Sonntag, W. E., Freeman, W. M., 2011. Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol Dis.* 43:201-12.

- VanGuilder, H. D., Freeman, W. M., 2011. The hippocampal neuroproteome with aging and cognitive decline: past progress and future directions. *Front Aging Neurosci.* 3:8.
- VanGuilder, H. D., Bixler, G. V., Sonntag, W. E., Freeman, W. M., 2012. Hippocampal expression of myelin-associated inhibitors is induced with age-related cognitive decline and correlates with deficits of spatial learning and memory. *J Neurochem.* 121:77-98.
- VanGuilder Starkey, H. D., Van Kirk, C. A., Bixler, G. V., Imperio, C. G., Kale, V. P., Serfass, J. M., Farley, J. A., Yan, H., Warrington, J. P., Han, S., Mitschelen, M., Sonntag, W. E., Freeman, W. M., 2012. Neuroglial expression of the MHCI pathway and PirB receptor is upregulated in the hippocampus with advanced aging. *J Mol Neurosci.* 48:111-26.
- Venkatesh, K., Chivatakarn, O., Lee, H., Joshi, P. S., Kantor, D.B., Newman, B. A., Mage, R., Rader, C., Giger, R. J., 2005. The Nogo-66 receptor homolog Ngr2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci.* 25(4):808-22.
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M., Rapoport, T. A., 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell.* 124(3):573-86.
- Voineskos, A. N., 2009. Converging evidence for the Nogo-66 receptor gene in schizophrenia. *The Journal of Neuroscience*, 29(16), 5045-5047.
- Vojtěchová, I., 2014. Separace hipokampálních funkcí v Morrisově vodním bludišti a v aktivním vyhýbání se místu pomocí alternačního protokolu. Diplomová práce, Universita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie živočichů.
- Wakana, Y., Koyama, S., Nakajima, K., Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Tani, K., Hauri, H. P., Melancon, P., Tagaya, M., 2005. Reticulon 3 is involved in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and golgi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1198–1205.
- Wakefield, S., Tear, G., 2006. The *Drosophila* reticulon, Rtnl-1, has multiple differentially expressed isoforms that are associated with a sub-compartment of the endoplasmic reticulum. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(17), 2027-2038.
- Walmsley, A. R., McCombie, G., Neumann, U., Marcellin, D., Hillenbrand, R., Mir, A. K., Frentzel, S., 2004. Zinc metalloproteinase-mediated cleavage of the human Nogo-66 receptor. *J Cell Sci.* 117(Pt 19):4591-602.
- Wan, Q., Kuang, E., Dong, W., Zhou, S., Xu, H., Qi, Y., Liu, Y., 2007. Reticulon 3 mediates Bcl-2 accumulation in mitochondria in response to endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*, 12(2):319-28.
- Wang, F., Liang, Z., Hou, Q., Xing, S., Ling, L., He, M., Pei, Z., Zeng, J., 2007. Nogo-A is involved in secondary axonal degeneration of thalamus in hypertensive rats with focal cortical infarction. *Neurosci Lett.* 417:255–260.
- Wang, H., Shen, J., Xiong, N., Zhao, H., Chen, Y., 2011a. Protein kinase B is involved in Nogo-66 inhibiting neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroreport.* 22(15):733-8. doi: 10.1097/WNR.0b013e32834a58e8.
- Wang, H., Xiong, Y., Mu, D., 2012. PirB restricts neuronal regeneration in developing rat brain following hypoxia-ischemia. *Mol Med Rep.* 6(2):339-44. doi: 10.3892/mmr.2012.907.
- Wang, J., Chan, C. K., Taylor, J. S., Chan, S. O., 2008. The growth-inhibitory protein Nogo is involved in midline routing of axons in the mouse optic chiasm. *Journal of neuroscience research*, 86(12), 2581-2590.

- Wang, J., Wang, L., Zhao, H., Chan, S. O., 2010b. Localization of an axon growth inhibitory molecule Nogo and its receptor in the spinal cord of mouse embryos. *Brain research*, 1306, 8-17.
- Wang, K. C., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R., He, Z., 2002a. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 420(6911), 74-78.
- Wang, T., Wang, J., Yin, C., Liu, R., Zhang, J. H., Qin, X., 2010a. Downregulation of Nogo receptor promotes functional recovery by enhancing axonal connectivity after experimental stroke in rats. *Brain Res*, 1360:147–158.
- Wang, X., Chun, S. J., Treloar, H., Vartanian, T., Greer, C. A., Strittmatter, S. M., 2002b. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *The Journal of Neuroscience*, 22(13):5505-15.
- Wang, X., Duffy, P., McGee, A. W., Hasan, O., Gould, G., Tu, N., Harel, N. Y., Huang, Y., Carson, R. E., Weinzimmer, D., Ropchan, J., Benowitz, L. I., Cafferty, W. B., Strittmatter, S. M., 2011b. Recovery from chronic spinal cord contusion after Nogo receptor intervention. *Annals of neurology*, 70(5), 805-821.
- Watari, A., Yutsudo, M., 2003. Multi-functional gene ASY/Nogo/RTN-X/RTN4: apoptosis, tumor suppression, and inhibition of neuronal regeneration. *Apoptosis*, 8(1):5-9.
- Weinmann, O., Schnell, L., Ghosh, A., Montani, L., Wiessner, C., Wannier, T., Rouiller, E., Mir, A., Schwab, M. E., 1998. Intrathecally infused antibodies against Nogo-A penetrate the CNS and downregulate the endogenous neurite growth inhibitor Nogo-A. *J. Neurosci.* 18, 10429–10437.
- 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.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., Bear, M. F., 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 313(5790):1093-7.
- Wiessner, C., Bareyre, F. M., Allegrini, P. R., Mir, A. K., Frentzel, S., Zurini, M., Schnell, L., Oertle, T., Schwab, M. E., 2003. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(2), 154-165.
- Willi, R., Aloy, E. M., Yee, B. K., Feldon, J., Schwab, M. E., 2009. Behavioral characterization of mice lacking the neurite outgrowth inhibitor Nogo-A. *Genes Brain Behav.* 8(2), 181-192. doi: 10.1111/j.1601-183X.2008.00460.x.
- 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.
- Wills, Z. P., Mandel-Brehm, C., Mardinly, A. R., McCord, A. E., Giger, R. J., Greenberg, M. E., 2012. The nogo receptor family restricts synapse number in the developing hippocampus. *Neuron*. 73(3):466-81. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.029.

- Winzler, A. M., Mandemakers, W. J., Sun, M. Z., Stafford, M., Phillips, C. T., Barres, B.A., 2011. The lipid sulfatide is a novel myelin-associated inhibitor of CNS axon outgrowth. *J Neurosci.* 31(17):6481-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3004-10.2011.
- Wojcik, S., Engel, W. K., Askanas, V., 2006. Increased expression of Nogo-A in ALS muscle biopsies is not unique for this disease. *Acta Myol.* 25:116-118.
- Woolf, C. J., 2003. No Nogo: now where to go? *Neuron* 38, 153-156.
- Xiong, L., Rouleau, G.A., Delisi, L.E., St-Onge, J., Najafee, R., Riviere, J.B., Benkelfat, C., Tabbane, K., Fathalli, F., Danics, Z., Labelle, A., Lal, S., Joobar, R., 2005. CAA insertion polymorphism in the 30UTR of Nogo gene on 2p14 is not associated with schizophrenia. *Molecular Brain Research* 133, 153–156.
- Xu, B., Hsu, P. K., Karayiorgou, M., Gogos, J. A., 2012. MicroRNA dysregulation in neuropsychiatric disorders and cognitive dysfunction. *Neurobiology of disease*, 46(2), 291-301.
- Yan, R., Shi, Q., Hu, X., Zhou, X., 2006. Reticulon proteins: emerging players in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci.* 63: 877–889.
- Yang, J., Yu, L., Bi, A. D., Zhao, S. Y., 2000. Assignment of the human reticulon 4 gene (RTN4) to chromosome 2p14-->2p13 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet.* 88(1-2):101-2.
- Yang, Y., Liu, Y., Wei, P., Peng, H., Winger, R., Hussain, R. Z., Ben, L. H., Cravens, P. D., Gocke, A. R., Puttaparthi, K., Racke, M. K., McTigue, D. M., Lovett-Racke, A. E., 2010. Silencing Nogo-A promotes functional recovery in demyelinating disease. *Annals of neurology*, 67(4), 498-507.
- Yang, Y. S., Strittmatter, S. M., 2007. The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biol*, 8(12), 234.
- Yang, Y. S., Harel, N. Y., Strittmatter, S. M., 2009. Reticulon-4A (Nogo-A) redistributes protein disulfide isomerase to protect mice from SOD1-dependent amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 29: 13850–13859.
- Yiu, G., He, Z., 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8), 617-627.
- Yokota, T., Mishra, M., Akatsu, H., Tani, Y., Miyauchi, T., Yamamoto, T., Kosaka, K., Nagai, Y., Sawada, T., Heese, K., 2006. Brain site-specific gene expression analysis in Alzheimer's disease patients. *Eur J Clin Invest.* 36(11):820-30.
- Yu, J., Fernández-Hernando, C., Suarez, Y., Schleicher, M., Hao, Z., Wright, P. L., DiLorenzo, A., Kyriakides, T. R., Sessa, W. C., 2009. Reticulon 4B (Nogo-B) is necessary for macrophage infiltration and tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(41):17511-6. doi: 10.1073/pnas.0907359106.
- 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.
- Zhang, L., Kuang, X., Zhang, J., 2011. Nogo receptor 3, a paralog of Nogo-66 receptor 1 (NgR1), may function as a NgR1 co-receptor for Nogo-66. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(11), 515-523.
- Zhao, X., Jantti, J., 2009. Functional characterization of the trans-membrane domain interactions of the Sec61 protein translocation complex beta-subunit. *BMC Cell Biol.* 10, 76.

- Zheng, B., Ho, C., Li, S., Keirstead, H., Steward, O., Tessier-Lavigne, M., 2003. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron*, 38(2), 213-224.
- Zheng, B., Atwal, J., Ho, C., Case, L., He, X. L., Garcia, K. C., Steward, O. Tessier-Lavigne, M., 2005. Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1205-1210.
- Zheng, B., Lee, J. K., Xie, F., 2006. Genetic mouse models for studying inhibitors of spinal axon regeneration. *Trends Neurosci* 29:640–646.
- Zhou, Y., Qian, R., Rao, J., Weng, M., Yi, X., 2010. Expression of PirB in normal and injured spinal cord of rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 30(4):482-5. doi: 10.1007/s11596-010-0453-1.
- Zhou, X., Hu, X., He, W., Tang, X., Shi, Q., Zhang, Z., Yan, R., 2011. Interaction between amyloid precursor protein and Nogo receptors regulates amyloid deposition. *FASEB J* 25:3146–3156.
- 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.

## 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., Bahník, S., Schönig, K., Berger, S., Vales, K., Tews, B., Schwab, M.E., Bartsch, D., Stuchlík, 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., Bahník, S., Zemanova, A., Schönig, K., Berger, S., Tews, B., Bartsch, D., Schwab, M. E., Sumova, A., Stuchlík, 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 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., Bahník, 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., Kubík, 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**