

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Iveta Vojtěchová

**Inhibitory axonální regenerace a jejich význam pro
neuroplasticitu, chování a paměť**

Inhibitors of axonal regeneration and their importance for
neuroplasticity, behaviour and memory

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tomáš Petrásek

Praha, 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Benešově, 20. 8. 2012

Iveta Vojtěchová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Mgr. Tomáši Petráskovi za ochotu a čas, který mi při psaní bakalářské práce věnoval, za odbornou pomoc a cenné rady. Bez něho by práce nevznikla v takovéto podobě.

Ráda bych poděkovala také svému kamarádovi Tomášovi, který mi při tvorbě práce radil a pomáhal zejména s technickými záležitostmi.

Můj velký dík patří rovněž všem mým dobrým přátelům, kteří mě podporovali nejen při psaní této práce.

A samozřejmě děkuji i své rodině, která mi poskytla zázemí a umožnila mi studovat.

Abstrakt

Centrální nervová soustava vyšších obratlovců, na rozdíl od periferní, neregeneruje. Příčinou je především přítomnost řady růstových inhibitorů produkovaných gliovou jizvou a oligodendrocyty, z nichž nejdůležitější jsou MAG (*myelin-associated glycoprotein*), OMgp (*oligodendrocyte-myelin glycoprotein*) a především Nogo protein. Nogo-A je jednou ze tří izoform Nogo proteinu vyskytující se primárně v mozku a míše, kde v dospělosti způsobuje degradaci růstových kuželů, inhibuje růst neuritů, omezuje neuroplasticitu a znemožňuje regeneraci poraněných axonů. Pro příjem signálu slouží Nogo receptorový komplex, na něj navazující signální dráha pak způsobuje destabilizaci aktinových vláken. Existují ale i další receptory pro Nogo-A, například PirB receptor. Během vývoje je Nogo-A exprimován ve velké míře neurony, v dospělosti jsou však hlavními producenty oligodendrocyty. Je pozoruhodné, že neuronální exprese Nogo-A po narození neklesá ve strukturách s vysokou plasticitou. Mezi ně patří také hipokampus, který je významný zejména pro prostorové učení a paměť. V něm Nogo-A udržuje rovnováhu mezi synaptickou plasticitou a stabilitou a omezuje dlouhodobou potenciaci. Tato bakalářská práce proto kromě výše zmíněného dále představuje některé behaviorální metody použité ke studiu učení a paměti u Nogo deficientních modelů a zvířat s akutní inaktivací Nogo-A proteinu, konkrétně úlohy Morrisovo vodní bludiště, *two-way active avoidance learning*, vodní T-bludiště, prepulsní a latentní inhibice. Tyto testy přinesly zajímavé výsledky a naznačují také možnou souvislost Nogo deficiencie se schizofrenií.

Klíčová slova: centrální nervová soustava, axonální regenerace, Nogo protein, Nogo receptor, behaviorální metody, učení a paměť

Abstract

The central nervous system of higher vertebrates, in contrast to the peripheral one, doesn't regenerate. That is because of the presence of many growth inhibitors produced by a glial scar and oligodendrocytes; the most important inhibitors are MAG (myelin-associated glycoprotein), OMgp (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) and mainly Nogo protein. Nogo-A is one of three isoforms of the Nogo protein located primarily in the brain and the spinal cord where it causes the degradation of growth cones, inhibits the growth of neurites, restricts the neuroplasticity and prevents the regeneration of injured axons in adulthood. The Nogo receptor complex serves for a reception of signals and the following signal cascade causes the destabilisation of actin filaments. There are also other receptors for Nogo-A, e. g. the PirB receptor. During the development, Nogo-A is highly expressed by neurons but in adulthood, the main producers are oligodendrocytes. It is noteworthy, that neuronal expression of Nogo-A doesn't decrease after birth in structures with high plasticity, e. g. in the hippocampus which is important especially for spatial learning and memory. In the hippocampus, Nogo-A keeps a balance between the synaptic plasticity and stability and restricts the long-term potentiation. Therefore, this bachelor's thesis presents information about the topics mentioned above and also about some behavioral methods focused on learning and memory in Nogo deficient models and animals with an acute inactivation of Nogo-A protein; namely Morris water maze, two-way active avoidance learning, water T-maze, prepulse and latent inhibition tasks. These tests have brought interesting results and also indicate a possible association of the Nogo deficiency with schizophrenia.

Key words: central nervous system, axonal regeneration, Nogo protein, Nogo receptor, behavioral methods, learning and memory

Obsah

Úvod	7
1 Nogo protein	9
1.1 Struktura Nogo-A proteinu a srovnání s ostatními izoformami	9
1.2 Funkce Nogo proteinu, především izoformy Nogo-A	11
1.3 Výskyt izoform Nogo proteinu	12
1.3.1 Lokalizace v rámci organismu	12
1.3.2 Lokalizace v rámci buňky	14
2 Receptory pro Nogo protein	16
2.1 Nogo receptorový komplex a signální dráha	16
2.1.1 Nogo receptor	16
2.1.2 Receptorový komplex a signální dráha	17
2.2 PirB receptor	18
2.3 Další receptory	19
3 Studium Nogo signalizace	21
3.1 Nogo-A a jeho přítomnost v hipokampu	21
3.2 Nogo protein a behaviorální metody zaměřené na učení a paměť	22
3.2.1 Morrisovo vodní bludiště	22
3.2.2 <i>Two-way active avoidance learning</i>	27
3.2.3 Vodní T-bludiště	27
3.2.4 Prepulsní inhibice	28
3.2.5 Latentní inhibice	29
3.2.6 Shrnutí	30
Závěr	31
Přehled použité literatury	31

Úvod

Je známo, že v periferní nervové soustavě (PNS) obratlovců existují mechanismy, které umožňují regeneraci nervové tkáně po mechanickém poškození, a tak její funkční obnovu v postiženém místě (Ramon y Cajal, 1928, podle Davidoff, 1929). Rozsáhlá schopnost regenerace axonů centrální nervové soustavy (CNS) – tedy mozku a míchy – je taktéž přirozenou součástí života nižších obratlovců (Bastmeyer a kol., 1991; Matsukawa a kol., 2004; Chernoff, 1996).

Poškozené axony v dospělé CNS vyšších obratlovců (plazů, ptáků a savců) ale neregenerují (Ramon y Cajal, 1928, podle Davidoff, 1929; Bastmeyer a kol., 1991; Keirstead a kol., 1995) a poškození způsobené úrazy nebo neurodegenerativními onemocněními bývá proto ireverzibilní. Regenerativní potenciál ovšem neurony CNS mají. Projeví se, pokud dojde k odstranění prostředí vytvářeného centrálními gliemi a neurony se dostanou do okolí glií periferních (Richardson a kol., 1980; David & Aguayo, 1981). Na této neschopnosti regenerace má podíl jednak aktuální stav uvnitř neuronu (tím je myšlena především správná hladina cyklických nukleotidů), jednak faktory vnějšího prostředí (Qiu a kol., 2000). Příčinou omezené regenerace axonů v CNS v souvislosti s okolím neuronu není, jak by se mohlo zdát, nedostatek růstových faktorů, ale především přítomnost růstových inhibitorů produkovaných gliovými buňkami, jež regeneraci axonů aktivně brání (Schwab & Thoenen, 1985). Vnitřek i okolí neuronu se vzájemně ovlivňují a mají na regeneraci neuronu společný vliv. Inhibitory totiž mohou nepřímo blokovat zvýšení hladiny cAMP. Pokud jsou však neurony vystaveny účinkům neurotropinů (růstových faktorů) dříve, než začnou působit inhibitory (tzv. *priming*), může být aktivita inhibitorů blokována a v důsledku toho zvýšena hladina cAMP a umožněna regenerace (Cai a kol., 1999).

Inhibitorů zabraňujících axonům růst existuje celá řada a souvisí s přítomností myelinu nebo gliové jizvy. Jako příklad lze uvést proteoglykany s chondroitin sulfátovými postranními řetězci (CSPGs) produkované gliovou jizvou, které mají inhibiční vlastnosti *in vitro* i v oblastech bohatých na CSPGs *in vivo* (Niederöst a kol., 1999; Bradbury a kol., 2002). Mezi další gliovou jizvou produkované inhibitory lze řadit semaforiny (např. semaforin-4D; Moreau-Fauvarque a kol., 2003). Mezi inhibiční proteiny produkované oligodendrocyty a asociované s myelinem patří třeba efrin-B3 (Benson a kol., 2005) či netrin-1 (Lów a kol., 2008) a zejména MAG (*myelin-associated glycoprotein*; McKerracher a kol., 1994; Mukhopadhyay a kol., 1994), OMgp (*oligodendrocyte-myelin glycoprotein*; Wang KC a kol.,

2002a) a Nogo protein (Chen a kol., 2000; GrandPré a kol., 2000), u nichž se předpokládá největší inhibiční aktivita. Nogo-A, jedna ze tří izoform Nogo proteinu, je typický pro vyšší obratlovce. U ryb a ocasatých obojživelníků chybí, žáby jsou v evoluci první skupinou, u nichž byl Nogo-A identifikován (Klinger a kol., 2004a). Zajímavé je, že receptory pro Nogo protein se vyskytují již u ryb (Klinger a kol., 2004b). Jejich přirozený ligand a funkční význam jsou ale odlišné než u savců.

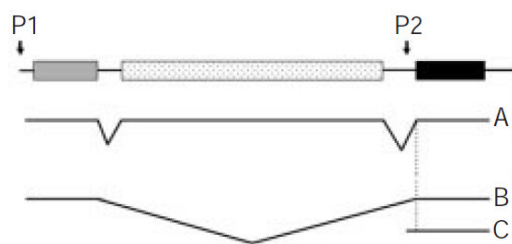
Právě Nogo protein patří k nejdůležitějším a nejstudovanějším inhibitorům regenerace axonů CNS a je spolu s příslušným receptorovým komplexem, signální dráhou a dalšími receptory hlavním tématem následujících stran. Neméně důležitou součástí této práce je představení některých etologických metod a jejich výstupů, jež se používají při výzkumu souvisejícím s Nogo signalizací. Nejlepšími pomocníky při těchto testech se ukázali být laboratorní potkani a laboratorní myši, některé výsledky byly získány i na makacích a kosmanech.

1 Nogo protein

Nogo je membránový protein patřící do retikulonové rodiny proteinů (*Reticulon family*) – proto je také známý pod názvem Reticulon 4. Je kódován stejnojmenným genem *nogo* (též *reticulon-4* nebo *RTN4*), který byl spolu s proteinem poprvé popsán v roce 2000 (Chen a kol., 2000; GrandPré a kol., 2000). Jsou známy další tři retikulonové geny – *RTN1*, *RTN2* a *RTN3*, jejichž produkty sdílejí stejnou doménu (RTN nebo RHD, *reticulon homology domain*), ovšem jejich funkce v organismu je víceméně neznámá (Oertle a kol., 2003a).

Nogo protein se vyskytuje ve třech hlavních izoformách, které vznikají alternativním sestřihem genu *RTN4*: Nogo-A, Nogo-B a Nogo-C (obr. 1; Chen a kol., 2000).

Nogo-A s velkou pravděpodobností odpovídá již dříve popsaným proteinům NI-35 a NI-250 u potkanů a bNI-220/NI-220 u skotu/člověka (Chen a kol., 2000; Caroni & Schwab, 1988; Spillmann a kol., 1998).



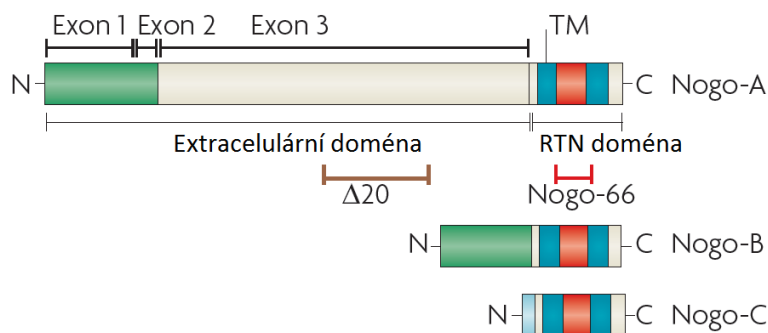
Obr. 1 Hypotetický mechanismus tvorby tří *nogo* transkriptů – A, B a C, a tak možný vznik tří alternativních Nogo izoform – Nogo-A, -B a -C. P1 a P2 značí hypotetické promotory. (Převzato z Chen a kol., 2000.)

1.1 Struktura Nogo-A proteinu a srovnání s ostatními izoformami

Evolučně konzervovanou součástí nejen Nogo-A, ale i dalších proteinů, je RTN doména (Oertle a kol., 2003a). Je společná všem třem izoformám Nogo proteinu a vykazuje vysokou podobnost s RTN doménami ostatních proteinů retikulonové rodiny. Skládá se ze dvou hydrofobních úseků o délce 35 a 36 aminokyselin (každý z nich prochází přes membránu), které jsou od sebe odděleny hydrofilním segmentem složeným z 66 aminokyselin a proto nazvaným Nogo-66. RTN doménu tvoří celkem 188 aminokyselin a patří k ní i posledních pár desítek aminokyselin C-konce (obr. 2; GrandPré a kol., 2000; Chen a kol., 2000; Oertle a kol., 2003a).

N-koncové domény jsou oproti tomu mnohem méně konzervované, mají velice rozdílnou délku a aminokyselinové složení u různých retikulonových proteinů (GrandPré a kol., 2000; Dodd a kol., 2005). U Nogo-A je N-konec kódován exonem 1 a tvoří ho sekvence 172 aminokyselin (obr. 2; Chen a kol., 2000). Následován je krátkou sekvencí kódovanou

exonem 2. Nejdelší úsek této izoformy tvoří její střední část, která je složená z asi 800 aminokyselin a kódovaná samostatným exonem 3; tato doména je Nogo-A-specifická (obr. 2; Chen a kol., 2000; Oertle a kol., 2003b). Jedním z funkčně nejdůležitějších je fragment NiG- Δ 20 (Nogo- Δ 20) nacházející se přibližně uprostřed exonu 3, v rozsahu aminokyselin 544–725. Spolu s ním hraje významnou roli také již výše popsaná smyčka Nogo-66 (Oertle a kol., 2003c). Nogo-A je celkově složený z 1163 aminokyselin a je tak nejdelší izoformou Nogo proteinu (Chen a kol., 2000).



Obr. 2 Struktury tří hlavních izoform Nogo proteinu. Zeleně je označen úsek kódovaný exonem 1, který je identický u Nogo-A a Nogo-B. U Nogo-A je navíc krátká sekvence kódovaná exonem 2 a naopak dlouhá sekvence kódovaná exonem 3 (světle šedá), jejíž součástí je i funkční doména NiG- Δ 20 (Δ 20, hnědá úsečka). Světle modrou barvou je vyznačen Nogo-C-specifický N-konec. Zároveň lze vidět RTN doménu společnou Nogo-A, Nogo-B i Nogo-C izoformám a složenou ze dvou transmembránových domén (TM, modře) a hydrofilní smyčky Nogo-66 (červeně). (Převzato ze Schwab, 2010 a upraveno.)

Izoforma Nogo-B s 360 aminokyselinami je výrazně kratší, protože v ní chybí exony 2 a 3. N-koncovou částí, která je identická s exonem 1 u Nogo-A, navazuje přímo na RTN doménu (obr. 2; Chen a kol., 2000; Oertle a kol., 2003b). Nemá tedy žádnou specifickou sekvenci a při použití některých metod se proto stává neodlišitelným od Nogo-A (např. při užití AS Bianca protilátky specifické pro N-konec, který je shodný u Nogo-A i Nogo-B; Huber a kol., 2002; Oertle a kol., 2003c).

Nogo-C je sestavený ze 199 aminokyselin (Chen a kol., 2000) a je tak nejkratší izoformou, jejíž N-terminální úsek obsahující pouze několik málo aminokyselin je napojen rovnou na RTN doménu (obr. 2). Tuto izoformu však lze, na rozdíl od Nogo-B, dobře odlišit od zbylých dvou izoform. Její N-koncová doména je totiž Nogo-C-specifická, protože ji kóduje odlišný promotor než ten, který řídí syntézu primárních transkriptů N-konců pro Nogo-A a Nogo-B (obr. 1; Oertle a kol., 2003b).

1.2 Funkce Nogo proteinu, především izoformy Nogo-A

Hlavními a nejdůležitějšími úlohami Nogo-A izoformy ve zralé CNS jsou inhibice růstu neuritů a omezení plasticity ve zdravé nervové tkáni, zároveň je jedním z nejvýznamnějších proteinů zamezujících regeneraci poraněných axonů (Chen a kol., 2000; GrandPré a kol., 2000; Oertle a kol., 2003c). Jako důkazy mohou posloužit výsledky některých pokusů. Například podání Nogo-A-specifické protilátky blokuje jeho funkci, a umožňuje tak funkční obnovu v důsledku zlepšené regenerace axonů (typicky protilátka IN-1; Chen a kol., 2000; Schnell & Schwab, 1990, podle Chen a kol., 2000; Bregman a kol., 1995, podle Chen a kol., 2000; nebo jiné protilátky; Liebscher a kol., 2005; Freund a kol., 2009), podobně fungují protilátky proti některým dalším členům signální dráhy (Lehmann a kol., 1999; Fournier a kol., 2003). Stejně tak mutantní myši postrádající Nogo-A nebo některý z důležitých členů signální dráhy prokazují zvýšenou regenerační schopnost (Dimou a kol., 2006; Zheng a kol., 2005).

Tyto funkce jsou pro Nogo-A evolučně nové a specifické a z tohoto faktu lze odvodit souvislost s taktéž evolučně novou N-terminální doménou a Nogo-A-specifickým regionem spíše než s evolučně starší částí proteinu (Dodd a kol., 2005). K tomuto tvrzení přispívá i zjištění, že ostatní retikulonové proteiny stejnou inhibiční aktivitu nevykazují (GrandPré a kol., 2000).

Extracelulární smyčka Nogo-66 hraje roli především v degradaci růstového kužele (Oertle a kol., 2003c). Jestliže je Nogo-66 blokován nebo pokud chybí receptor vázající Nogo-66, není tento segment schopen vykonávat svou činnost – růstový kužel nedegraduje, naopak dochází k elongaci axonu, formování nových větví a tvorbě synapsí a po zranění může nastat funkční obnova (Li kol., 2004; Kim a kol., 2004).

Nogo-A hraje významnou úlohu také ve vyvíjející se CNS. Zde reguluje především migraci neuronů například při rozvoji mozkové kůry, kde je produkován jak gliovými buňkami, tak migrujícími i migraci dokončivšími neurony (Mathis a kol., 2010; Mingorance-Le Meur a kol., 2007). Protože se Nogo-A hojně vyskytuje v růstových kuželech, ovlivňuje také růst neuritů a jejich větvení a omezuje vzájemnou adhezi axonů, a tedy i tvorbu svazků nervových vláken (Mingorance-Le Meur a kol., 2007; Petrinovic a kol., 2010). Při *in vitro* pokusech s knock-out myšmi byly ale získány dva odlišné výsledky: v prvním případě byl pozorován nárůst počtu větví (Mingorance-Le Meur a kol., 2007), v případě druhém došlo k redukci větvení a zároveň ke spojování nervových vláken do svazků (Petrinovic a kol.,

2010). Mignorange-Le Meur a jeho tým (2007) ovšem použili Nogo-A/B/C mutantní myši, kdežto k výzkumu u skupiny Petrinovice (2010) byly využity myši s mutací pouze v Nogo-A. Dalo by se proto uvažovat o možnosti, že na regulaci větvení se podílí i jiná z izoform Nogo proteinu – Nogo-B, případně Nogo-C, který by eventuálně dokázal chybějící izoformu vykompenzovat. Příčinou však může být také fakt, že každý pracoval s jiným typem nervových buněk: Mignorange-Le Meur (2007) s kortikálními neurony, Petrinovic (2010) s neurony zadních kořenů míšních.

Kromě výše uvedeného souvisí přítomnost Nogo-A v pozdějších vývojových stádiích CNS s vytvářením myelinu. U deficientních myší, kterým chyběl gen pro Nogo-A, došlo ke zpoždění diferenciaci oligodendrocytů, a tak i opožděné tvorbě myelinové pochvy (Pernet a kol., 2008). Myelinizace ovšem přesto nakonec nastala. To nám může napovědět, že Nogo-A není jediným proteinem, který tento proces ovlivňuje, ale že mu napomáhá ještě látka jiná, a že vznikají kompenzační mechanismy.

Zdá se, že tato izoforma má ještě další přídatné funkce, které se netýkají CNS, ale jiných typů buněk ostatních periferních tkání, kupříkladu fibroblastů (Oertle a kol., 2003c).

Nogo protein má navíc speciální intracelulární úlohu, jež souvisí zvláště s morfologií a fungováním endoplasmatického retikula (ER) za normálních podmínek (Nogo-A; Voeltz a kol., 2006) a jeho patofyziologií v souvislosti s buněčným stresem (Nogo-B; shrnuto v mini-review Teng & Tang, 2008).

Funkcí Nogo-B je patrně zejména přestavba cév a její regulace, tedy ovlivnění migrace endoteliálních buněk a buněk vaskulárního hladkého svalstva a podpora adheze buněk (Acevedo a kol., 2004). Ve spojitosti s tím má také vliv na opravu poraněných cév a je nezbytný pro obnovu správného toku krve (Yu a kol., 2009). To by mohlo vysvětlovat jeho tak četnou distribuci v těle organismu (viz dále).

Nogo-C nebyl doposud důkladně prozkoumán a zatím se o jeho funkci téměř nic neví.

1.3 Výskyt izoform Nogo proteinu

1.3.1 Lokalizace v rámci organismu

Již bylo řečeno, že Nogo-A je s myelinem asociovaný inhibitor růstu neuritů CNS, je tedy zřejmé, že jeho výskyt je charakteristický pro mozek a míchu. Vzniká ve zralé CNS

nejen v myelinu tvořeném oligodendrocyty (lokalizován zejména na vnitřní adaxonální a vnější membráně myelinové pochvy, nalezen i v tělech a výběžcích oligodendrocytů; GrandPré a kol., 2000; Chen a kol., 2000; Huber a kol., 2002), ale i v neuronech některých částí mozku (GrandPré a kol., 2000; Chen a kol., 2000; Josephson a kol., 2001; Huber a kol., 2002; Hunt a kol., 2003), a během vývoje organismu také v oligodendrocytech (v souvislosti s myelinací) a zvláště v neuronech. Nebyl však detekován v gliové jizvě kolem ani přímo v místě léze. Zajímavé je, že Northern a Western blot analýzy dokazují přítomnost nižších hladin Nogo-A také v srdci a ve varlatech (obr. 3; Huber a kol., 2002). Dále se vyskytuje ve vyvíjejících se kosterních svalech, ne však v dospělosti (Josephson a kol., 2001; O'Neill a kol., 2004).

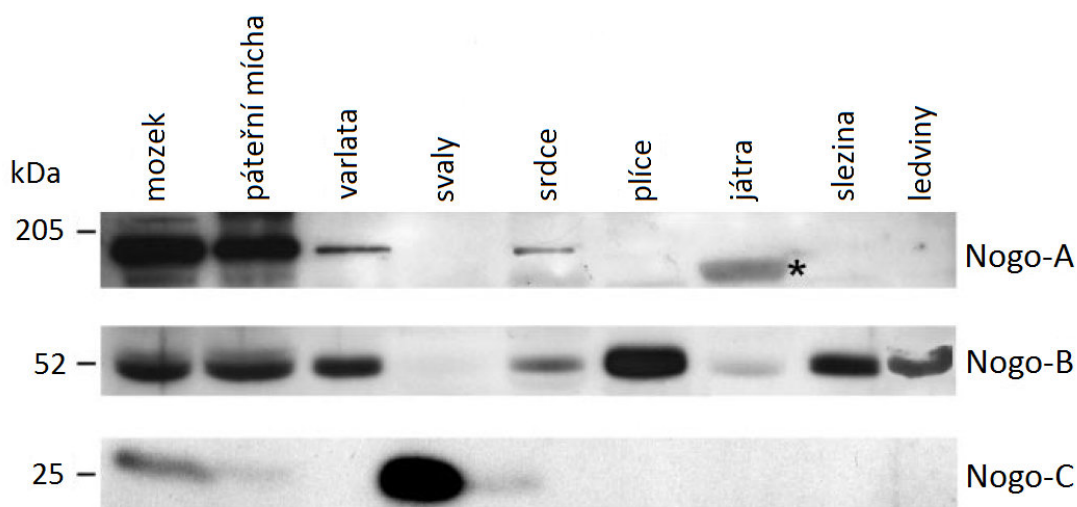
Bylo zjištěno, že množství exprimovaného Nogo-A v oligodendrocytech se po traumatické lézi v mozku nebo míše signifikantně nemění, tedy nezvyšuje ani nesnižuje (Huber a kol., 2002), oproti některým jiným přítomným látkám, např. MBP (*myelin basic protein*), u něhož po lézi dochází v určitých časových intervalech nejprve k úbytku, poté nárůstu a opětovnému snížení hladiny na úroveň srovnatelnou se stavem před vznikem léze (Bartholdi & Schwab, 1998). Při studii nedotčená tkáň v okolí léze dál produkovala Nogo-A v normálním množství, a podílela se tak na inhibici regenerace. Infiltrující buňky plnicí oblast léze ani buňky gliové jizvy tento protein nevytvářely, a neměly tak na inhibici žádný vliv (Huber a kol., 2002). Jiné studie ovšem odhalily, že buňky obklopující lézi v míše vykazovaly nárůst Nogo-A, léze samotná byla pro Nogo-A negativní (Hunt a kol., 2003; Wang X a kol., 2002).

Nogo-B je také velmi rozšířený v CNS, ovšem stejně tak v nervovém systému periferním a je také součástí dalších periferních tkání. Nebyl však detekován v kosterním svalstvu (obr. 3). Nogo-C je významný především v periferních tkáních – je silně exprimován v kosterních svalech, kde v dospělosti nahrazuje Nogo-A, a v menší míře také v srdečním svalstvu a mozkové a míšní tkáni (obr. 3). *In situ* hybridizace prokázala jeho přítomnost například také v kůži či střevním epitelu. I tyto dvě izoformy byly nalezeny v nervové soustavě jak dospělé, tak vyvíjející se (Huber a kol., 2002; Chen a kol., 2000).

Pomocí *in situ* hybridizace, při které byly použity sondy komplementární k Nogo-A-specifické sekvenci a k sekvenci sdílené Nogo-A, Nogo-B i Nogo-C, se prokázalo, že ani jedna ze tří izoform se nenachází v astrocytech, Schwannových buňkách či ependymocytech mozkových komor a míšního kanálu (Josephson a kol., 2001).

Exprese Nogo-A v jiných než nervových tkáních a různorodá lokalizace dalších Nogo izoform, naznačuje, že kromě hlavní úlohy, kterou je inhibice růstu axonů u Nogo-A, má

Nogo rodina proteinů velmi pravděpodobně ještě další přídatné fyziologické funkce. Izoformy Nogo-B a Nogo-C ale zatím nejsou dostatečně prozkoumány (Huber a kol., 2002).



Obr. 3 Expresce tří izoform Nogo proteinu v různých typech tkání dospělého potkana zjištěná Western blot analýzou. Nogo-A je nejvíce exprimován v mozku a páteřní míše a v malém množství také ve varlatech a srdci. Proužek označený hvězdičkou představuje nespecifický signál. Nogo-B byl detekován téměř ve všech uvedených typech tkání, tedy mozku, páteřní míše, varlatech, srdci, plicích, játrech, slezině a ledvinách. Kosterní svaly nevykazovaly známky přítomnosti této izoformy. Oproti tomu exprese Nogo-C je nejsilnější právě v kosterním svalstvu, v malé míře je lokalizován také v mozku, páteřní míše a srdeční tkáni. (Převzato z Huber a kol., 2002 a upraveno.)

1.3.2 Lokalizace v rámci buňky

Nogo-A je transmembránový protein, jehož průchod přes membránu a kotvení v ní umožňují dva hydrofobní úseky na C-konci, které jsou součástí RTN domény. Sekvence Nogo-66 ležící mezi nimi je exponována do extracelulárního prostoru (GrandPré a kol., 2000; Oertle a kol., 2003c) a stejně tak i N-konec se sekvencí specifickou pro Nogo-A (obr. 5; Oertle a kol., 2003c; Dodd a kol., 2005). Obě tyto oblasti s inhibiční funkcí ční do mezibuněčného prostoru, a proto se lze domnívat, že jejich receptory se nachází taktéž mimo buňku. Součástí Nogo-A proteinu je také intracelulární C-koncová část, která uvnitř buňky asociuje s ER a Golgiho komplexem (GrandPré a kol., 2000; Oertle a kol., 2003c).

Ukázalo se, že specifický N-koncový region může být vystaven i do cytosolu na intracelulární straně cytoplasmatické membrány (obr. 4; GrandPré a kol., 2000; Oertle a kol., 2003c). To podporuje hypotézu, že Nogo-A se vyskytuje nejméně ve dvou odlišných membránových topologiích (Oertle a kol., 2003c; Dodd a kol., 2005). Zároveň lze

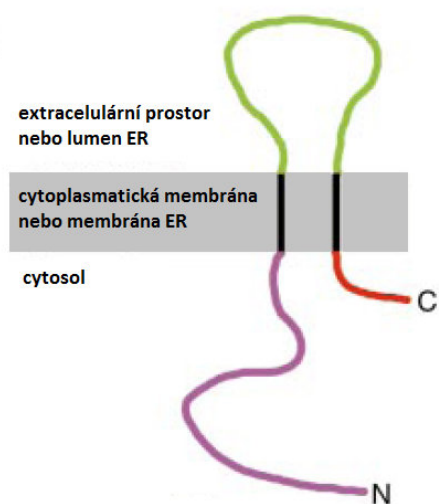
předpokládat i pravděpodobnou existenci přídatných funkcí a přítomnost dalšího, tentokrát intracelulárního, receptoru vázajícího Nogo-A.

Tento protein ale nemusí být ukotven pouze v povrchové membráně buňky, nýbrž i v membráně ER (obr. 4). Tahle možnost je pro oligodendrocyty dokonce mnohem častější (GrandPré a kol., 2000; Chen a kol., 2000; Oertle a kol., 2003c; Dodd a kol., 2005). I zde se uplatňuje topologie s cytosolickou N-terminální doménou. Nogo-66 se v tomto případě nalézá v lumen ER (GrandPré a kol., 2000; Dodd a kol., 2005).

V souvislosti s různými topologiemi a možným umístěním v ER je zajímavé zjištění, že transmembránový Nogo-A nemá žádnou specifickou signální sekvenci pro zabudování do membrány (GrandPré a kol., 2000; Chen a kol., 2000; Oertle a kol., 2003c; Dodd a kol., 2005), a řadí se tak ke skupině zvláštních proteinů, které používají nepolární sekvenci jako signální kotvu. U Nogo-A se jedná o některou z C-koncových hydrofobních domén (Oertle a kol., 2003c; Dodd a kol., 2005).

Výše uvedená zjištění se týkají především oligodendrocytů, na nichž byl výzkum prováděn.

Za použití různých metod bylo dále vyzkoumáno, že Nogo-B a Nogo-C také prochází skrz membránu a nacházejí se na povrchu buněk (Dodd a kol., 2005).



Obr. 4 Model předpokládané struktury Rtn rodiny proteinů, jejímž členem je i Nogo-A, a zároveň jedna z jejich možných topologií. Černě jsou označeny hydrofobní domény procházející skrz cytoplasmatickou membránu nebo membránu ER, zeleně pak sekvence Nogo-66 vyčnívající do extracelulárního prostoru nebo lumen ER. Červená křivka představuje C-konec a fialová N-terminální doménu, obě exponované do cytosolu. (Převzato z GrandPré a kol., 2000 a upraveno.)

2 Receptory pro Nogo protein

Již z existence různých topologií Nogo-A proteinu a z faktu, že je složen z několika částí sice s podobnou funkcí, ale působící přes odlišné mechanismy, můžeme soudit, že receptorů pro tento protein je v organismu přítomno více typů. Ne všechny se však dodnes podařilo identifikovat.

2.1 Nogo receptorový komplex a signální dráha

2.1.1 Nogo receptor

Dosud nejprozkoumanějším receptorem v souvislosti s Nogo-A signalizací je Nogo receptor (NgR či NgR1, též *reticulon 4 receptor*) o délce 473 aminokyselin. Dalším synonymem pro něj je Nogo-66 receptor, protože interaguje především s extracelulární smyčkou Nogo-66. Tato vazba zprostředkovává degradaci růstového kužele, a tak zabraňuje růstu axonů a znemožňuje jim regenerovat (Fournier a kol., 2001). Jestliže je přerušeno spojení mezi Nogo-66 a NgR nebo je receptor akutně blokován protilátkou, neurony se stávají necitlivé k Nogo-66 segmentu a mohou být schopny růstu a regenerace (Fournier a kol., 2001; Fournier a kol., 2002; Lee a kol., 2004). Naopak citlivost neuronů k Nogo-66 lze navodit uměle, když se nervová tkáň, která NgR normálně nevytváří, donutí tento receptor exprimovat (Fournier a kol., 2001). Některé studie získaly za použití NgR deficientních myší podobné výsledky jako při akutní blokaci receptoru (Kim a kol., 2004; Lee a kol., 2004). Ovšem jiné práce dokazují, že nedochází-li k expresi NgR v dlouhodobém měřítku, efekt výrazně zlepšeného růstu a šíření axonů se nedostaví a axony neregenerují (Kim a kol., 2004; Zheng a kol., 2005; Chivatakarn a kol., 2007). Můžeme tak předpokládat vytvoření kompenzačních mechanismů nezávislých na tomto receptoru a souvisejících s typem neuronu a oblastí CNS (viz rozdílné výsledky například v práci Kim a kol., 2004).

NgR se nachází v nervových buňkách CNS na povrchu růstového kužele axonů a tato lokalizace odpovídá jeho funkci. Nebyl detekován v oligodendrocytech (Fournier a kol., 2001; Wang X a kol., 2002). K cytoplasmatické membráně je připoután glykosyl-fosfatidylinositolovou (GPI) kotvou; patrně je proto součástí membránového raftu. Jedná se o protein bohatý na aminokyselinu leucin, která se v jeho sekvenci velmi často opakuje

(*leucine-rich-repeat protein*, LRR; Fournier a kol., 2001). Konkrétně jde o úsek osmi LRR segmentů ze stran obklopených N-koncovou LRR (LRRNT) a C-terminální LRR (LRRCT) doménou. Na úplném N-konci má ještě signální sekvenci a mezi LRRCT a místem GPI kotvy se nachází unikátní sekvence přibližně 100 aminokyselin (Barton a kol., 2003). Bylo zjištěno, že pro vazbu Nogo-66 k receptoru a zajištění plné funkčnosti je vyžadováno všech osm LRR domén i LRRNT a LRRCT domény (Fournier a kol., 2002).

NgR váže kromě Nogo-66 také myelinové inhibitory OMgp (Wang KC a kol., 2002a) a MAG (Domeniconi a kol., 2002; Liu a kol., 2002) se stejným výsledným efektem. MAG má ale ještě vyšší afinitu k homolognímu receptoru NgR2, který je také exprimován v CNS (Venkatesh a kol., 2005). Kromě něho existuje ještě další příbuzný receptor NgR3, ale ani jeden z těchto dvou homologních receptorů nevykazuje, navzdory velmi podobné struktuře, žádnou afinitu k ostatním NgR ligandům (Barton a kol., 2003).

V nedávné době byl nalezen i další ligand pro NgR – s myelinem neasociovaný protein BlyS (*B lymphocyte stimulator*), jenž způsobuje, podobně jako myelinové inhibitory, avšak nezávisle na nich, degradaci a inhibici růstu axonů. Využívá při tom nejspíše stejnou signální dráhu. (Zhang a kol., 2009).

Kromě toho jsou tento receptor spolu s NgR3 zároveň receptory pro chondroitin sulfát proteoglykany (CSPGs) – inhibitory produkované buňkami gliové jizvy (Dickendesher a kol., 2012). Toto i výše uvedená zjištění přispívají ke zdůraznění komplexity celého inhibičního systému.

NgR se vyskytuje v nervových buňkách, ovšem ne ve všech částech CNS. Některé oblasti tento receptor neprodukují, přesto je u jejich neuronů regenerace inhibována. Z tohoto důvodu lze uvažovat o přítomnosti ještě dalších receptorů, které jsou schopny Nogo-66 nebo další zmíněné inhibitory vázat (Hunt a kol., 2002; Josephson a kol., 2002). Josephson a kol. (2002) také naznačují možnou souvislost Nogo signalizace s pamětí. Nogo-A mRNA a NgR mRNA jsou totiž silně exprimovány i v oblastech s poměrně vysokou plasticitou jako je například hipokampus. Ten je zároveň strukturou důležitou právě pro paměť.

2.1.2 Receptorový komplex a signální dráha

NgR postrádá transmembránovou doménu, avšak signál musí být nějak přenesen do cytoplasmy axonu (Fournier a kol., 2001). K tomu slouží s NgR asociované membránové proteiny: neurotrofinový receptor p75 (Wang KC a kol., 2002b; Wong a kol., 2002) nebo

TROY (*tumour necrosis factor- α receptor superfamily member 19*; Park a kol., 2005) a LINGO-1 (*LRR and Ig domain-containing, Nogo Receptor-interacting protein*; Mi a kol., 2004; obr. 5).

Tyto koreceptory pak aktivují následující členy signální dráhy, kterými jsou malá GTPáza RhoA, její efektorový protein ROCK (*Rho-associated kinase*; obr. 5) a další, jež vedou k destabilizaci aktinového cytoskeletu; tak může dojít k degradaci růstového kužele (Fournier a kol., 2003; Lehmann a kol., 1999; Niederöst a kol., 2002; Montani a kol., 2009). Použitím blokátorů komponent z této signální dráhy lze zamezit degradaci růstového kužele, a tak umožnit axonům růst, šířit se a regenerovat a obnovit jejich funkci. Aplikovány byly například C3 transferáza proti RhoA (Fournier a kol., 2003; Lehmann a kol., 1999) či Y-27632 protilátka inaktivující ROCK (Fournier a kol., 2003). První jmenovaný blokátor *in vivo* neuspěl ve zlepšení růstu neuritů kortikospinální dráhy, avšak druhá látka při využití stejného typu neuronů *in vivo* umožnila regeneraci axonů a urychlila obnovu lokomoce (Fournier a kol., 2003). Na základě tohoto rozdílného výsledku se můžeme domnívat, že ROCK komponenta je méně nahraditelná než RhoA i výše postavení členové signální dráhy, jejichž nedostatek je kompenzován jinými proteiny.

Protein Rac1 je, stejně jako RhoA, malá GTPáza regulující stabilitu cytoskeletu a je v procesu degradace růstového kužele také zapojený. Působí antagonisticky oproti RhoA a jeho přirozené utlumení tuto degradaci podporuje (Niederöst a kol., 2002).

Kromě této dráhy má velký význam také změna hladiny cAMP (Cai a kol., 1999; Cai a kol., 2001) a uvolňování vápníku z intracelulárních zásob do cytosolu (obr. 5; Bandtlow a kol., 1993).

2.2 PirB receptor

Již bylo uvedeno, že musí existovat další mechanismy nezávislé na NgR, a tedy vyžadující jiné typy receptorů. Jedním takovým je receptor PirB (*paired immunoglobulin-like receptor B*; obr. 5) lokalizovaný v neuronech v některých oblastech CNS (Syken a kol., 2006) a exprimovaný ve zvýšené míře po zranění míchy či optického nervu (Zhou a kol., 2010; Wang a kol., 2010; Cai a kol., 2012). S vysokou afinitou se k němu váže jak Nogo-66 segment Nogo proteinu, tak myelinové inhibitory MAG a OMgp. Z tohoto poznatku můžeme PirB receptoru přisuzovat schopnost degradovat růstový kužel, a tak inhibovat růst axonů.

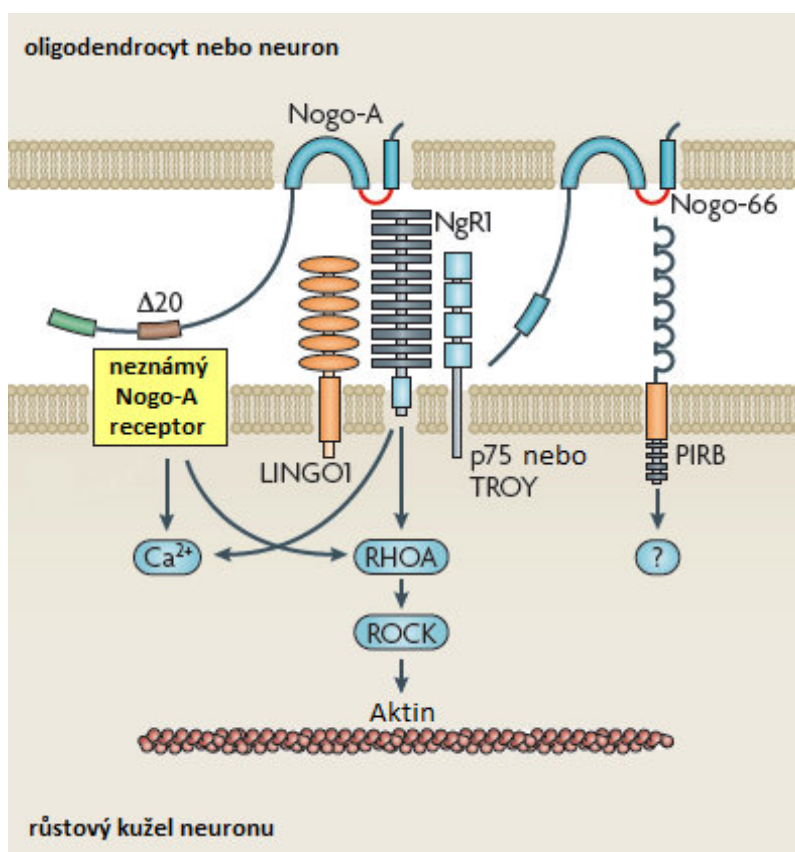
Tato vlastnost také byla dokázána blokadou PirB receptoru pomocí protilátky anti-PirB.1, kdy míra degradace růstového kužele byla znatelně nižší (Atwal a kol., 2008). V jiné studii došlo odstraněním genu pro PirB u mutantních myší ke zlepšení plasticity synaptických spojení ve zrakové kůře. PirB tedy hraje roli negativního regulátoru plasticity CNS (Syken a kol., 2006). Přesný mechanismus jeho působení ale zatím znám není.

Na degradaci růstového kužele a inhibici růstu neuritů způsobené myelinovými inhibitory se podílejí oba receptory PirB a NgR (Atwal a kol., 2008). To může vysvětlovat, proč v pracích Kim a kol. (2004) a Zheng a kol. (2005) neurony kortikospinální dráhy nebyly po odebrání genu pro NgR schopny regenerovat. Pro úspěšnější regeneraci *in vivo* bude tedy patrně nutné zamezit působení obou dvou receptorů. Zatím však není jasné, zda fungují paralelně nebo vzájemně spolupracují. PirB je možná v některých částech CNS dokonce důležitější než NgR, který pak slouží jako doplňující zprostředkovatel této inhibice. Bylo prokázáno, že odstranění genu pro NgR může ještě více zmenšit inhibici, která již byla zmírněna anti-PirB.1 protilátkou proti PirB receptoru. Pro blokadu akutní degradace růstového kužele však údajně stačí inaktivace pouze jednoho z nich (Atwal a kol., 2008).

2.3 Další receptory

Protože Nogo-A má kromě degradace růstového kužele navíc další funkce vázané na jiné části této izofomy, je zřejmé, že musí existovat ještě nějaký Nogo-A-specifický receptor. Možná jím je GPR50 (*G protein-coupled receptor 50*), receptor spřažený s G proteinem. Bylo prokázáno, že tento receptor interaguje s neuronálním Nogo-A a že oba proteiny se nachází v synapsích CNS. Pokusy ale překvapivě odhalily, že nadměrná exprese GPR50 vede ke zvýšenému růstu neuritů a má tedy opačný efekt než nadprodukce Nogo-A (Grünwald a kol., 2009). O všech funkcích a přesném působení tohoto receptoru se zatím ví jen velmi málo.

Byl identifikován také receptor NgBR (*Nogo-B specific receptor*), který tvoří specifickou vazbu s Nogo-B izoformou (důležitá je zejména sekvence aminokyselin 180 až 200 mezi N-koncem a RTN doménou). Receptor byl objeven v krevních cévách a tato jeho lokalizace souhlasí s výše uvedenými funkcemi Nogo-B (Miao a kol., 2006).



Obr. 5 Zjednodušené schéma znázorňující vzájemné vztahy mezi ligandy, jejich receptory a dalšími členy signální dráhy vedoucí k inhibici růstu a regenerace axonů. Nogo-A procházející membránou oligodendrocytu nebo neuronu váže svojí extracelulární Nogo-66 doménu k Nogo-66 receptoru (NgR1), jež je k membráně připoután GPI-kotvou. Spolu s transmembránovými proteiny LINGO-1 a p75/TROY tvoří receptorový komplex, který dále aktivuje v růstovém kuželu neuronu solubilní proteiny RhoA a ROCK způsobující destabilizaci aktinového cytoskeletu. Kromě toho je fragment Nogo-66 schopen vázat se k receptoru PirB. Pokračování této dráhy však zatím není známo, stejně jako receptor vázající Nogo-A-specifický NiG-Δ20. Naznačena je také souvislost se signalizací vápenatých iontů (Ca²⁺). (Převzato ze Schwab, 2010 a upraveno.)

3 Studium Nogo signalizace

Pomocí různých metod lze izolovat a *in vitro* studovat jeden konkrétní protein a jeho působení. Studie *in vivo* nám naopak umožňují vidět protein v širších souvislostech (vytváření kompenzačních mechanismů při jeho nepřítomnosti, interakce s více vazebnými partnery, vliv dalších faktorů apod.). Oba přístupy byly a jsou využívány při výzkumu Nogo signalizace. S pomocí behaviorálních metod se sleduje chování, motorika nebo lokomoce laboratorních zvířat po akutní blokaci anebo genetickém odstranění či dlouhodobé inaktivaci Nogo-A, NgR i dalších členů signální dráhy, případně funkční obnova po uměle vytvořené lézi v CNS, a srovnává se s týmiž vlastnostmi zvířat kontrolních, která tuto modifikaci neprodělala. Zajímavé poznatky poté může přinést porovnání *in vitro* a *in vivo* studií s podobnou tematikou.

Zbývající část této práce je věnována především behaviorálním testům zaměřeným na učení a paměť a úlohám významným v kontextu schizofrenie u Nogo deficientních modelů a zvířat s akutní inaktivací Nogo-A proteinu.

3.1 Nogo-A a jeho přítomnost v hipokampu

Nogo-A je během vývoje ve velké míře exprimován neurony (Josephson a kol., 2001). Po narození jeho neuronální exprese obvykle klesá (Huber a kol., 2002), což ale neplatí pro neurony, které si uchovávají poměrně vysokou plasticitu tvorby synaptických spojení i v dospělosti. Mezi takové patří i nervové buňky hipokampu (Meier a kol., 2003; Mingorance a kol., 2004).

V hipokampu se Nogo-A vytváří v pyramidových buňkách a interneuronech (Huber a kol., 2002). Udržuje zde rovnováhu mezi synaptickou plasticitou a stabilitou, tedy zabraňuje nadměrné tvorbě synapsí a vytvořené synapse stabilizuje. V plastické měnící se neuronální síti je jistá úroveň stability pro správné fungování nutná (Zagrebelky a kol., 2010; Delekate a kol., 2011). Zároveň ve zdravém dospělém hipokampu potlačuje dlouhodobou potenciaci (LTP, *long-term potentiation*; Delekate a kol., 2011). Konkrétně je za to zodpovědná Nogo-66 smyčka Nogo-A proteinu, která ovšem neovlivňuje presynaptické uvolňování neurotransmiterů, nýbrž mechanismus postsynaptický (Raiker a kol., 2010).

Na hipokampu závisí především prostorové učení a prostorová paměť (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Tyto schopnosti, a zejména jejich zlepšení či zhoršení, se zkoumají pomocí různých behaviorálních metod právě také u Nogo deficientních zvířat a modelů s akutní blokací tohoto proteinu.

Pro paměť je sice nejdůležitější strukturou hipokampus, částečně se však na ní podílí i jiné části mozku, především některé oblasti mozkové kůry.

3.2 Nogo protein a behaviorální metody zaměřené na učení a paměť

Nogo-A stabilizuje synapse a snižuje pravděpodobnost LTP. Když se u potkanů zmírnilo působení Nogo-A proteinu vlivem specifické protilátky 11C7 nebo se mu zamezilo odstraněním genu pro Nogo-A, hipokampální LTP vznikala snadněji a byla silnější. Ve druhém případě byl efekt poněkud slabší než po akutní blokaci (Delekate a kol., 2011). Pravděpodobně se vytvořily kompenzační mechanismy.

Díky těmto zjištěním má člověk tendenci předpokládat, že neutralizací Nogo-A nějakou protilátkou či delecí genu pro Nogo-A se zdokonalí paměť, a zvířata si tak rychleji osvojí úlohy zaměřené na učení. Jak ovšem napovídají některé výsledky z různých behaviorálních testů (viz dále), ne vždy domněnka odpovídá pravdě a někdy tomu může být přesně naopak. A tak se zdá, že množství Nogo-A vyskytující se ve zdravém dospělém hipokampu je nastaveno na optimální úroveň potřebnou pro udržení správné synaptické plasticity a zvýšení či snížení jeho exprese může mít za následek patologické změny.

3.2.1 Morrisovo vodní bludiště

Morrisovo vodní bludiště (MWM, *Morris water maze*; Morris, 1984) je prostorová úloha široce využívaná při výzkumu působení různorodých farmakologických látek, případně vlivu mozkových lézí, na paměť a prostorové a kognitivní schopnosti zvířecích modelů.

Bludiště (tzv. *maze*) je tvořeno kruhovou nádrží naplněnou vodou o teplotě asi 25 °C, pod jejíž hladinou je schovaný záchranný ostrůvek (tzv. *platform*). Je vyrobený z průhledného plexiskla, do vody se navíc přidávají netoxická přírodní barviva (dříve také mléko), aby se tak pojistilo, že ho zvíře opravdu neuvidí. Umístován je dostatečně daleko od středu i stěny

nádrže, nejčastěji doprostřed jednoho z jejích kvadrantů. Ostrůvek má v nejčastěji používané variantě (zaměřené na referenční paměť) stabilní polohu a mění se místa startu.

Úkolem laboratorního potkana či myši je naučit se vyhledávat skrytý ostrůvek a vylézt na něj. Musí se orientovat vizuálně pomocí různých orientačních bodů (tzv. *cues*) nacházejících se v experimentální místnosti vně bludiště a zapamatovat si je, a tak si zmapovat prostor. Zvíře je do vody vypouštěno od okraje nádrže a odebíráno z ostrůvku. Pokud se mu nepodaří dosáhnout cíle do předem stanoveného limitu, je na ostrůvek navedeno experimentátorem a až poté z bludiště odebráno.

Při testování je nejdůležitější určení doby latence (čas od vypuštění zvířete do nalezení ostrůvku), velmi často se zjišťuje i délka uplavané dráhy. Měřit se ale mohou i další veličiny jako například tigmotaxe (jedná se o typické instinktivní chování úzkostných zvířat nebo potkanů s poškozenými prostorovými schopnostmi, měřena je jako doba strávená u stěny nádoby), podíl času stráveného v cílovém kvadrantu s ostrůvkem, průměrná rychlost plavby a další.

Když si zvíře osvojí úlohu, je možné ho otestovat v bludišti bez ostrůvku (tzv. *probe trial*), jestli si pamatuje jeho původní polohu. V tom případě se zjišťuje potenciální doba latence (čas do prvního protnutí místa, ve kterém předtím ostrůvek stál), případně četnost protnutí (kolikrát by zvíře bylo schopno nalézt ostrůvek, kdyby tam stále byl).

V souvislosti s Nogo proteinem byly prováděny výzkumy, kdy po 24 hodinách po traumatickém poškození mozku (postižen byl hipokampus, ale i jiné oblasti mozku) byla po dobu 14 dnů podávána protilátka proti Nogo-A, konkrétně 11C7 (Lenzlinger a kol., 2005) nebo 7B12 (Marklund a kol., 2007). Byly porovnávány čtyři skupiny dospělých potkanů kmene Sprague-Dawley: s falešným poškozením mozku a kontrolní protilátkou, s falešným poškozením mozku a protilátkou 11C7 (resp. 7B12), s traumatickým poškozením mozku a kontrolní protilátkou, s traumatickým poškozením mozku a protilátkou 11C7 (resp. 7B12). Po čtyřech týdnech prokazovaly skupiny s traumatickým poškozením mozku delší latence nalezení ostrůvku než skupiny s poškozením falešným (kognice u potkanů bez mozkového poškození nebyla ovlivněna podávanými protilátkami). U skupin s traumatickým poškozením byl ovšem zaznamenán signifikantní rozdíl mezi těmi s neutralizací Nogo-A proteinu, u nichž se prokázalo větší zlepšení, měli kratší latence, a tedy rychleji nacházeli ostrůvek, než zvířata kontrolní. V rychlosti plavání a délce uplavané trasy se skupiny mezi sebou nijak neodlišovaly (Lenzlinger a kol., 2005; Marklund a kol., 2007). Marklund a kol. (2007) navíc pozorovali u skupiny potkanů s traumatickým poškozením mozku a protilátkou 7B12

zvýšenou expresi proteinu GAP-43 (*growth-associated protein-43*) v hipokampu oproti skupině kontrolní. Tento protein je důležitý regulátor axonálního růstu a neuronální plasticity, je přítomen v růstových kuželech a neuronálních spojích během synaptické remodelace a neuronálního pučení (shrnuto v review Benowitz & Routtenberg, 1997). Jeho zvýšená exprese po traumatickém poškození mozku je pravděpodobně prospěšná. Bylo dokázáno, že jeho vyšší exprese pozitivně koreluje s behaviorální obnovou (Hulsebosch a kol., 1998). Zvýšená exprese GAP-43 tak možná představuje nový molekulární mechanismus pro zesílení kognitivní obnovy po traumatickém poškození mozku zprostředkované inhibicí Nogo-A proteinu (Marklund a kol., 2007).

Gillani a kol. (2010) využili úlohu MWM pro zjištění, zda blokace funkce Nogo-A ovlivní kognitivní schopnosti Long-Evans potkanů po uměle vyvolané mozkové mrtvici. Protilátka 11C7 proti Nogo-A byla podávána po dobu 14 dnů s počátkem jeden týden po mrtvici. Bylo provedeno srovnání tří skupin starých zvířat (věk 18 měsíců): zdraví jedinci, po mrtvici s kontrolní protilátkou, po mrtvici s 11C7 protilátkou. Ukázalo se, že skupina, která prodělala mozkovou mrtvici a dostala 11C7 protilátku, byla schopna úlohu zvládnout lépe než skupina po mrtvici s kontrolní protilátkou; nejrychleji se však učila zvířata zdravá. Při hledání ostrůvku byly obě skupiny po mrtvici méně přesné než jedinci s nepoškozeným mozkem. Tytéž dvě postižené skupiny se také v průběhu pokusu chovaly více tigmotakticky; na konci pokusu se však tigmotaxe u všech skupin vyrovnala. V probe trialu ani v testu zkoumajícím pracovní paměť, při kterém se každý den měnila poloha ostrůvku, se ovšem výkon jednotlivých skupin nelišil (Gillani a kol., 2010). Zdá se, že imunoterapie zastavující fungování Nogo-A napomáhá k rychlejší kognitivní obnově po mozkové mrtvici. Nicméně autoři usuzují, že mrtvice nemá přílišný vliv na prostorovou pracovní paměť.

Překvapivých výsledků ovšem bylo dosaženo při delecí genu pro Nogo-A (tzv. knock-out modely, KO). Takto geneticky modifikované myši v MWM neprokazovaly žádné signifikantní rozdíly ve srovnání s kontrolními jedinci. Obě skupiny se úlohu učily stejně dobře, KO myši neprojevovaly jakékoli abnormality v prostorovém učení (Willi a kol., 2009). Dlouhodobě utlumená exprese Nogo-A proteinu patrně vyvolává (zvýšenou) tvorbu jiných látek s podobnou funkcí, které jsou schopny ho zastoupit a jeho ztrátu tak kompenzovat. Vlivem toho nemusí dojít k žádným patologickým projevům, jak prokázali Willi a kol. (2009) v souvislosti s prostorovým učením a pamětí.

Zjišťovány byly také kognitivní funkce při dvojité delecí genu pro Nogo-A i Nogo-B po mozkové lézi (Marklund a kol., 2009). Porovnávaly se následující skupiny myší: geneticky nemodifikované (wild-type, wt), heterozygoti v obou izoformách (Nogo-A/B^{+/-}), homozygoti

v obou izoformách (Nogo-A/B^{-/-}) a každá z těchto skupin byla ještě rozdělena na dvě podle toho, jestli prošla falešným, nebo traumatickým poškozením mozku. Obecně lze říci, že ti s falešným poškozením zvládli úlohu lépe, učili se rychleji a dosáhli podobných výsledků. Mezi wt jedinci a heterozygoty s traumatickou lézí nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl, ovšem homozygotní myši s delecí v obou izoformách po traumatickém poškození mozku měly delší latence dosažení ostrůvku než obě tyto skupiny (a zároveň u nich obnova motorické funkce probíhala déle, a byla tak opožděná; Marklund a kol., 2009). Protože u Nogo-A/B^{-/-} myši po mozkové lézi došlo k menší obnově motorického i kognitivního deficitu než u wt a heterozygotů s traumatickým poškozením mozku, pravděpodobně úplně neplatí původní hypotéza Kima a kol. (2003), že absence Nogo-A/B zvyšuje axonální regeneraci a zlepšuje obnovu. Autoři navrhují, že důvodem může být souvislost s hypomyelinizací, která údajně u myši nastává po zranění mozku. Rozdílné výsledky mohou být také zapříčiněny jiným typem zranění CNS: Kim a kol. (2003) poškodili páteřní míchu, Marklund a kol. (2009) způsobili traumatické poškození mozku. Další odlišností je stáří testovaných zvířat: Kim a kol. (2003) zkoumali mladé myši (věk 7–14 týdnů), Marklund a kol. (2009) myši zestárlé (věk 12 měsíců). Význam tak může mít i vývojový aspekt, pro stará zvířata nemusí být oproti mladým delece Nogo-A/B proteinů výhodná. Kromě toho může hrát roli také genetické pozadí: každý tým použil jiný kmen myši. Nelze ani vyloučit, že v regeneraci a obnově je nějakým způsobem zapojená i Nogo-B izoforma. V porovnání s výsledky práce Willi a kol. (2009), kde byl použit Nogo-A KO model a tyto jedinci se neodlišovali od ostatních skupin, Marklund a kol. (2009) ukazují, že skupina myši s dvojitou delecí genů pro Nogo-A i Nogo-B má horší projevy učení než zbylé skupiny myši.

Zajímavá je práce Masliah a kol. (2010), která ukazuje možnou spojitost mezi funkcí Nogo proteinu a Alzheimerovou chorobou (*Alzheimer's disease*, AD). Zde došlo k odstranění genů dokonce všech tří izoform Nogo proteinu (Nogo-A, Nogo-B i Nogo-C), zároveň byl vložen transgen APP (*amyloid precursor protein*), který způsobuje fenotyp podobný AD. Při vývoji AD totiž dochází k akumulacím β -amyloid proteinu v synapsích. Tento protein se šíří a působí toxicky na neurony, které degenerují (Nath a kol., 2012). V počáteční fázi rozvoje nemoci dochází nejen k rozpadu synapsí, ale zároveň ke kompenzačnímu pučení neuritů. To pokračuje i v dalším průběhu nemoci, avšak v pozdějším stupni už spíše přispívá k neurodegenerativním procesům (Geddes & Cotman, 1991, podle Masliah a kol., 2010). Pučení neuritů může být tedy jak prospěšné, tak i škodlivé. Přítomnost tohoto pučení napovídá, že průběh AD (a zejména jeho raná fáze) možná souvisí právě s Nogo proteinem jakožto inhibítorem axonálního pučení. Cílem práce tak bylo zjistit, zda delece *nogo* změní

průběh této nemoci (Masliah a kol., 2010). AD postihuje přednostně hipokampus, proto se projevuje především zhoršující se paměť a problémy s kognicí (Bures & Fenton, 2000). Byly vytvořeny transgenní myši produkující APP a současně postrádající geny pro Nogo-A/B/C (APP Nogo^{-/-}) a porovnávaly se s dalšími třemi skupinami myší: transgenní s APP a heterozygoti v Nogo (APP Nogo^{+/-}), netransgenní a s delecí v genu pro Nogo (Nogo^{-/-}), netransgenní a heterozygoti v Nogo (Nogo^{+/-}). Obě transgenní skupiny měly delší latence nalezení ostrůvku než jedinci bez transgenu (Masliah a kol., 2010). To by mohlo dokazovat rozvoj fenotypu AD. Netransgenní Nogo^{-/-} se nelišili od netransgenních Nogo^{+/-}. Signifikantní zlepšení v průběhu pokusu však nastalo u transgenních zvířat APP Nogo^{-/-} ve srovnání s transgenními myši APP Nogo^{+/-}, délka jejich latencí se blížila výkonům obou netransgenních skupin. V probe trialu tatáž skupina strávila více času v cílovém kvadrantu s původní polohou ostrůvku než transgenní heterozygoti. Z těchto výsledků lze soudit, že delece genu pro Nogo-A/B/C zlepšuje deficit učení a paměti u transgenních APP modelů a zlepšuje tak kognitivní schopnosti zejména v rané a střední fázi Alzheimerovy choroby. Zároveň delece *nogo* zlepšuje neuropatologický výsledek, protože umožňuje výhodné pučení axonů. Nemá však vliv na hromadění β -amyloidu ani jeho metabolismus (Masliah a kol., 2010).

VanGuilder a kol. (2011, 2012) použitím MWM úlohy dokázali zhoršenou kognitivní schopnost u starých potkanů (hybridi Fischer 344 \times Brown Norway) a zároveň možnou souvislost funkce Nogo-A proteinu s tímto zhoršením. Zvířata byla po vykonání pokusu rozdělena do tří skupin: dospělí (věk 12–13 měsíců), staří bez kognitivního deficitu (věk 26–28 měsíců), staří kognitivně zhoršení (věk 26–28 měsíců). Potkani ze staré kognitivně zhoršené skupiny měli průměrně delší latence nalezení ostrůvku a častěji se pohybovali ve větších vzdálenostech od něj, v probe trialu přeplavali přes místo původní polohy ostrůvku méněkrát než zbylé dvě skupiny a celkově se v úloze zlepšovali pomaleji. To naznačuje slabší prostorovou orientaci a schopnost učit se. U těchto starých kognitivně narušených potkanů autoři pozorovali zvýšenou expresi hipokampálního Nogo-A i jiných s myelinem asociovaných proteinů s inhibiční funkcí. Toto zesílení exprese přispívá k synaptické rigiditě, znesnadňuje vznik nových synapsí a koreluje tak se zhoršenou paměť a kognitivními schopnostmi.

3.2.2 *Two-way active avoidance learning*

Zařízení pro úlohu *two-way active avoidance learning* představuje komora, která je rozdělená na dva stejné kompartmenty průchozí přepážkou (tzv. *two-way box*), takže zvíře může volně přecházet z jednoho do druhého. Přes mřížovou podlahu jsou dávány elektrické šoky. Tato úloha zahrnuje jednak klasické, jednak instrumentální podmiňování. Zvíře se učí provést operantní akt, tj. vyhnout se určitému místu, jako odpověď na zvukový stimulus. Pokud ho nevykoná, dostane elektrický šok (o síle 0,3 mA). V podstatě se jedná o averzivní učení a tzv. negativní posilování. Podmiňování probíhalo následovně. Zvířata byla vkládána do komor a dostávala sekvenci náhodných zvukových stimulů v intervalech 40 ± 15 sekund. Pokud zvíře nereagovalo na stimulus do pěti sekund, dostalo elektrický šok v koincidenci se zvukem. Šok trval maximálně dvě sekundy, ale mohl být ukončen dříve útekem zvířete z místa podání šoku (tzv. úniková odpověď). Když zvíře opustilo prostor do pěti sekund od zaznění tónu, zvukový signál skončil a zvíře se tak vyhnulo šoku. Při testování experimentátoři věnovali pozornost především tomu, kolikrát zvíře uteklo před šokem v závislosti na prezentovaném zvukovém stimulu. Pro zjištění obecné lokomoční aktivity se zaznamenával počet spontánních útěků během intervalu mezi stimuly (Willi a kol., 2009; Willi a kol., 2010; Yee a kol., 2006).

Porovnávány byly dvě skupiny myší: knock-out s delecí genu pro Nogo-A a kontrolní zvířata bez genetické modifikace. U obou skupin došlo v průběhu pokusu k nárůstu počtu útěků po podmíněném stimulu, což dokazuje schopnost učit se. Nebyl mezi nimi však žádný signifikantní rozdíl, byly stejně úspěšné. Spontánní lokomoční aktivita se taktéž nelišila mezi oběma genotypy (Willi a kol., 2009; Willi a kol., 2010). Odstranění genu pro Nogo-A tedy pravděpodobně nemá v tomto typu paměťových úloh žádný vliv na schopnost učení, nebo se genetická delece vůbec neprojevuje podobně jako je tomu u Morrisova vodního bludiště.

3.2.3 **Vodní T-bludiště**

Vodní T-bludiště (*water T-maze*) je behaviorální úloha zkoumající diskriminační reversalové učení. V první fázi testu (tzv. akvizici) se měla zvířata naučit rozeznávat pravé a levé rameno bludiště tvaru písmene „T“. Pouze jedno z nich (toto si měla zvířata zvolit) totiž vedlo na únikovou plošinu, která byla skryta pod vodní hladinou. Druhá fáze pokusu

(tzv. reversal) se vyznačovala tím, že experimentátoři přesunuli plošinu na konec druhého, původně nesprávného, ramena bludiště. Zvířata tak musela pochopit, co se změnilo, a přeučit se. Vyhodnocen byl poté procentuální podíl správně zvolených ramen pro akvizici i reversal (Willi a kol., 2010).

Srovnání dvou souborů myší – knock-out modelů postrádajících gen pro Nogo-A a kontrol bez genetické úpravy – přineslo následující poznatky. V akvizici nebyl nalezen mezi oběma skupinami v učení žádný rozdíl. Reversal však odhalil u myší s genetickou delecí horší schopnost přeučení, zvířata měla méně správných výběrů než kontroly (Willi a kol., 2010). Tento deficit v učení a zatvrzelé opakování dříve naučeného (tzv. perseverativní chování) jsou specifické právě pro přeučovací fázi a obdobné projevy se vyskytují i u pacientů se schizofrenií (Ridley, 1994).

3.2.4 Prepulsní inhibice

Normální reakcí zvířete na hlasitý zvuk je tzv. úleková reakce. Její intenzitu však lze redukovat, pokud pulsnímu podnětu vyvolávajícímu toto leknutí předchází méně hlasitý prepulsní stimulus (Hoffman & Searle, 1965, podle Willi a kol., 2010). O to právě jde v úloze **prepulsní inhibice** (*prepulse inhibition*). Zvířeti nacházejícímu se v akustické komoře byl prezentován zvukový pulsní stimulus o intenzitě 120 dB_A po dobu 40 ms, jež vyvolal úlekovou reakci. Utlumení úlekového reflexu mělo být dosaženo použitím 20 ms trvajících prepulsního stimulu o různé intenzitě (69, 73, 77, 81 a 85 dB_A), který zazněl 100 ms před hlavním pulzním stimulem. Prepulsní inhibice se zaznamenávala jako procentuální podíl inhibice úlekové odpovědi pro každou úroveň prepulsní intenzity (Willi a kol., 2010).

Willi a kol. (2010) použili tuto úlohu pro srovnání dvou skupin myší: s delecí genu pro Nogo-A a kontrolní bez modifikace. U kontrolních zvířat došlo k normální redukcii úlekového reflexu, její síla se navíc zvětšovala se vzrůstající intenzitou prepulsních stimulů. Knock-out myši však neprojevovaly tak velkou prepulsní inhibici a její výsledek byl nezávislý na intenzitě prepulsních podnětů (Willi a kol., 2010). Jak je vidět, delece genu pro Nogo-A zmírňuje projev prepulsního utlumení. Není bez zajímavosti, že tento deficit v prepulsní inhibici je zařazován mezi významné symptomy schizofrenie u člověka a že je přítomen i u animálních modelů (Braff a kol., 2001).

3.2.5 Latentní inhibice

Úloha **latentní inhibice** (*latent inhibition*) zahrnuje klasické podmiňování a týká se důležitosti stimulů a přirozeného potlačení jejich vnímání, pokud jsou bezvýznamné. Latentní proto, že zpočátku se neprojeví. Tato úloha obsahuje čtyři fáze. V té první (tzv. preexpozice) je část zvířat vystavena opakovaným 30 sekund trvajícím zvukovým stimulům v různých intervalech 40 ± 30 sekund. Jiná část zvířat žádné zvukové signály neslyší, pouze stráví stejný čas v identické komoře. Po této fázi okamžitě bez jakékoli manipulace s pokusnými zvířaty následuje fáze druhá (tzv. podmiňování), při níž jsou zvířatům prezentovány tytéž stejně dlouho trávající zvukové stimuly. Ovšem ihned po skončení každého stimulu zvíře dostane elektrický šok (0,25 mA, délka 1 sekunda) a podmiňuje si tak vzájemnou souvislost mezi oběma podněty. Tyto stimulus-šok páry jsou od sebe odděleny 180 sekund dlouhými intervaly. Opakuje se třikrát. Po 24 hodinách následuje třetí fáze pokusu (tzv. kontextový test), která zahrnuje nepřerušovaný 480 sekund trávající zvukový stimulus. Čtvrtá a poslední fáze testu (tzv. zvukový test) nastává o dalších 24 hodin později, kdy je zvířatům prezentován zvukový signál po dobu 180 sekund. Na základě předchozí zkušenosti zvíře reaguje kratší či delší dobou nehybnosti (tzv. freezing, zamrznutí). Freezing, podmíněná odpověď na zvukový stimulus byla vyjádřena jako procentuální podíl času zamrznutí pro všechna testovací sezení (Willi a kol., 2010).

Willi a kol. (2010) porovnali opět dvě skupiny myší: s odstraněným genem pro Nogo-A a geneticky neupravované kontroly. Ve stadiu podmiňování byl u kontrolní skupiny, která prošla v první fázi experimentu prezentací zvukových stimulů, pozorován kratší freezing (větší latentní inhibice) než u jedinců bez stimulů. U knock-out modelů byl efekt latentní inhibice slabší. V kontextovém testu bylo freezing nízké u všech skupin bez rozdílu. U zvířat, která zpočátku dostávala zvukové signály, zvukový test ukázal u kontrol redukci freezingu (větší latentní inhibici), zatímco skupina s genetickou delecí měla latentní inhibici podstatně menší (delší freezing). V podmínkách bez podání prvotních zvukových stimulů se ale kontrolní a knock-out skupiny signifikantně nelišily (Willi a kol., 2010). Výsledky dokazují, že delece genu pro Nogo-A narušuje latentní inhibici a prodlužuje tak u myší dobu nehybnosti. Knock-out zvířata mají zhoršenou schopnost selektivního asociativního učení v podmínkách, kdy v počáteční fázi opakovaně poslouchají neutrální zvukové stimuly. Tento deficit se rovněž projevuje u pacientů se schizofrenií (Baruch a kol., 1988, podle Willi a kol., 2010).

3.2.6 Shrnutí

Výsledky získané využitím Morrisova vodního bludiště naznačují, že akutní blokáce funkce Nogo-A proteinu má u potkanů pozitivní efekt na obnovu kognitivních schopností po poškození mozku (např. po mrtvici) a po mozkové lézi také zlepšuje prostorové učení a paměť. Dlouhodobá nefunkčnost Nogo-A způsobená odstraněním genu pro tento protein patrně nepřináší v tomto směru žádné výhody. Delece genů pro obě izoformy (Nogo-A/B) navíc ještě zhoršuje prostorovou orientaci a paměť a prodlužuje obnovu motorické funkce. Zdá se proto, že genetická delece a podání protilátky proti Nogo-A má na kognitivní schopnosti odlišný, a v některých ohledech dokonce opačný, efekt, který navíc závisí na použitém modelu. Nutno poznamenat, že knock-out všech tří izoform naopak přináší zlepšení u APP transgenních modelů a zmírňuje průběh změn ve zvířecím modelu Alzheimerovy choroby. Podobně jako delece genu ani zvýšená exprese Nogo-A není pro kognitivní funkce prospěšná.

V testu *two-way active avoidance learning* se neprojeví žádné rozdíly v genotypch. Ztráta genu pro Nogo-A tedy pravděpodobně neovlivňuje učení typu operantní podmiňování.

V ostatních třech metodách (vodní T-bludiště, prepulsní a latentní inhibice) byly však u knock-out modelů pozorovány abnormality. Tyto jevy – perseverativní chování, narušené sensorimotorické zpracování a porucha selektivní pozornosti – se podobají symptomům charakteristickým pro pacienty trpící schizofrenií. Mezi další takové projevy bývá zařazována například zvýšená citlivost k motorickému stimulantu amfetaminu projevující se větší hyperlokomocí, jež byla po podání tohoto farmaka zaznamenána i v testu ve volném poli (*open field*) rovněž u Nogo-A deficientních myší (Willi a kol., 2009; Willi a kol., 2010). Chování připomínající úzkost či strach a sociální interakce však nebyly u knock-out myší zasaženy, přestože jejich zhoršení (v prvním případě zvětšení, v druhém zmenšení) bývá také považováno za typické projevy schizofrenie. Výsledky těchto testů ovšem byly získány pouze v jedné laboratoři a na jednom modelu. K ověření obecné platnosti těchto závěrů by bylo nutné experimenty zopakovat s pomocí jiných metod transgeneze (např. knock-down), na jiném genetickém pozadí a ideálně i na jiných modelových organismech.

Závěr

Z dosavadních poznatků *in vitro* a *in vivo* studií zmíněných v této práci je zřejmé, že Nogo protein patří mezi nejdůležitější inhibitory axonálního růstu a regenerace (je dokonce významnější než myelinové inhibitory MAG a OMgp, jak prokázali Cafferty a kol., (2010)).

Především krátkodobá inaktivace Nogo-A specifickou protilátkou podporuje regeneraci axonů po jejich mechanickém poškození, napomáhá k lepšímu růstu neuritů a funkční obnově a taktéž urychluje kognitivní obnovu po poškození mozku, stejně tak zlepšuje paměť a učení po mozkové lézi. Podobné výsledky byly zaznamenány i při akutní blokaci NgR či některých dalších členů signální dráhy.

Výsledky získané na knock-out modelech jsou ale rozporuplné. Jak se zdá, nejenže delece neprokazuje na behaviorální úrovni žádné výhody, v některých případech může být dokonce škodlivá. Podobně delece genu pro NgR na buněčné úrovni v souvislosti s axonální regenerací nepřinesla ve všech případech kýžený efekt. Lze to vysvětlit tak, že dlouhodobá inaktivace způsobená odstraněním genu vyvolává tvorbu jiných látek, které jeho funkci zastoupí. Jak již bylo naznačeno, u delece Nogo-A se této kompenzace možná účastní i Nogo-B izoforma; funkci NgR asi může do jisté míry nahradit PirB receptor.

Je však nutné upozornit na skutečnost, že výsledky ovlivňuje řada faktorů. Mezi ně patří například odlišnosti mezi mozkem a míchou, záleží však i na typu laboratorních zvířat (myši, potkani, primáti) a jejich stáří, jsou patrné též mezikmenové rozdíly. Bylo by proto dobré provést další experimenty s využitím jiných metod a různých experimentálních zvířat.

Výsledky získané pomocí myších modelů nelze zobecňovat na potkana a už vůbec ne na člověka. I přesto se dnes zdá být Nogo protein (či Nogo receptor) slibným terapeutickým cílem v regenerativní medicíně a dává tak naději k léčbě poškození míchy, zranění mozku nebo následků mozkové mrtvice či neurodegenerativních poruch jako je například Alzheimerova choroba. Je však nutné včas odhalit případné nežádoucí účinky takových léčebných postupů, neboť zde možná hrozí riziko rozvoje duševního onemocnění. Určitým důvodem k opatrnosti je zde fakt, že Nogo-A deficientní myši vykazují některé prvky tzv. schizofrenii podobného chování, analogického klinickým příznakům schizofrenie. Pozitivní je ovšem skutečnost, že žádný z těchto symptomů se nevyskytl u myši s krátkodobou inaktivací, což lépe odpovídá situaci při uvažovaném terapeutickém podání příslušného blokátoru lidským pacientům. Deficity pozorované u knock-out myši, podobně jako schizofrenie u lidských pacientů, mají nejspíše neurovývojový původ. Zvířata s deficiencí Nogo proteinu by se tak mohla stát modelem tohoto onemocnění, který by usnadnil studium jeho mechanismů a možné léčby.

Přehled použité literatury

Acevedo L, Yu J, Erdjument-Bromage H, Miao RQ, Kim JE, Fulton D, Tempst P, Strittmatter SM, Sessa WC (2004). A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nature Medicine*, 10(4):382-8.

Atwal JK, 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):967-70.

Bandtlow CE, Schmidt MF, Hassinger TD, Schwab ME, Kater SB (1993). Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones. *Science*, 259(5091):80-3.

Bartholdi D, Schwab ME (1998). Oligodendroglial reaction following spinal cord injury in rat: transient upregulation of MBP mRNA. *Glia*, 23(3):278-84.

Barton WA, Liu BP, Tzvetkova D, Jeffrey PD, Fournier AE, Sah D, Cate R, Strittmatter SM, Nikolov DB (2003). Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *The EMBO Journal*, 22(13):3291-302.

***Baruch I, Hemsley DR, Gray JA (1988).** Differential performance of acute and chronic schizophrenics in a latent inhibition task. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 176(10):598-606.

Bastmeyer M, Beckmann M, Schwab ME, Stuermer CAO (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. *The Journal of Neuroscience*, 11(3):626-40.

Benowitz LI, Routtenberg A (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 20(2):84-91.

Benson MD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M, Parada LF (2005). Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 102(30):10694-9.

Bradbury EJ, Moon LDF, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881):636-40.

Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR (2001). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology*, 156(2-3):234-58.

***Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME (1995).** Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*, 378(6556):498-501.

- Bures J, Fenton AA (2000).** Neurophysiology of spatial cognition. *Physiology*, 15(5):233-240.
- Cafferty WBJ, Duffy P, Huebner E, Strittmatter SM (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):6825-37.
- Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT (1999).** Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron*, 22(1):89-101.
- Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT (2001).** Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *The Journal of Neuroscience*, 21(13):4731-9.
- Cai X, Yuan R, Hu Z, Chen C, Yu J, Zheng Z, Ye J (2012).** Expression of PirB protein in intact and injured optic nerve and retina of mice. *Neurochemical Research*, 37(3):647-54.
- Caroni P, Schwab ME (1988).** Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *The Journal of Cell Biology*, 106(4):1281-8.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000).** Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, 403(6768):434-9.
- Chernoff EAG (1996).** Spinal cord regeneration: a phenomenon unique to urodeles? *The International Journal of Developmental Biology*, 40(4):823-31.
- Chivatakarn O, Kaneko S, He Z, Tessier-Lavigne M, Giger RJ (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. *The Journal of Neuroscience*, 27(27):7117-24.
- David S, Aguayo AJ (1981).** Axonal elongation into peripheral nervous system „bridges“ after central nervous system injury in adult rats. *Science*, 214(4523):931-3.
- Davidoff LM (1929).** Book review: Degeneration and Regeneration of the Nervous System. By S. Ramon Y Cajal, M. D., F. R. S., Director of the Instituto Cajal, Madrid. Honorary Professor of Pathology in the University of Madrid. Translated and edited by Raoul M. May, Ph. D. (Harv.) D. ès Sc. (Paris). Laboratoires d'Anatomie et Histologie Comparées et de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Paris. (New York: Oxford University Press, American Branch, 1928, Vol. 1, pp. 396, and Vol. 2, pp. 369-769.). *The American Journal of Psychiatry*, 86(1):212-218.
- Delekate A, Zagrebelsky M, Kramer S, Schwab ME, Korte M (2011).** NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 108(6):2569-74.
- Dickendeshler TL, Baldwin KT, Mironova YA, Koriyama Y, Raiker SJ, Askew KL, Wood A, Geoffroy CG, Zheng B, Liepmann CD, Katagiri Y, Benowitz LI, Geller HM, Giger RJ (2012).** NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nature Neuroscience*, 15(5):703-12.

Dimou L, Schnell L, Montani L, Duncan C, Simonen M, Schneider R, Liebscher T, Gullo M, Schwab ME (2006). Nogo-A-deficient mice reveal strain-dependent differences in axonal regeneration. *The Journal of Neuroscience*, 26(21):5591-603.

Dodd DA, Niederoest B, Bloechlinger S, Dupuis L, Loeffler JP, Schwab ME (2005). Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13):12494-502.

Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang KC, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin MT (2002). Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*, 35(2):283-90.

Fournier AE, GrandPré T, Strittmatter SM (2001). Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*, 409(6818):341-6.

Fournier AE, Gould GC, Liu BP, Strittmatter SM (2002). Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *The Journal of Neuroscience*, 22(20):8876-83.

Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (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 ME, Rouiller EM (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):983-96.

***Geddes JW, Cotman CW (1991).** Plasticity in Alzheimer's disease: too much or not enough? *Neurobiology of Aging*, 12(4):330-3.

Gillani RL, Tsai SY, Wallace DG, O'Brien TE, Arhebamen E, Tole M, Schwab ME, Kartje GL (2010). Cognitive recovery in the aged rat after stroke and anti-Nogo-A immunotherapy. *Behavioural Brain Research*, 208(2):415-24.

GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM (2000). Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*, 403(6768):439-44.

Grünewald E, Kinnell HL, Porteous DJ, Thomson PA (2009). GPR50 interacts with neuronal NOGO-A and affects neurite outgrowth. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 42(4):363-71.

***Hoffman HS, Searle JL (1965).** Acoustic variables in the modification of startle reaction in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 60(1):53-8.

Huber AB, Weinmann O, Brösamle C, Oertle T, Schwab ME (2002). Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *The Journal of Neuroscience*, 22(9):3553-67.

Hulsebosch CE, DeWitt DS, Jenkins LW, Prough DS (1998). Traumatic brain injury in rats results in increased expression of Gap-43 that correlates with behavioral recovery. *Neuroscience Letters*, 255(2):83-6.

- Hunt D, Mason MRJ, Campbell G, Coffin R, Anderson PN (2002).** Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 20(4):537-52.
- Hunt D, Coffin RS, Prinjha RK, Campbell G, Anderson PN (2003).** Nogo-A expression in the intact and injured nervous system. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(4):1083-102.
- Josephson A, Widenfalk J, Widmer HW, 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):319-28.
- Josephson A, Trifunovski A, Widmer HR, Widenfalk J, Olson L, Spenger C (2002).** Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *The Journal of Comparative Neurology*, 453(3):292-304.
- Keirstead HS, Dyer JK, Sholomenko GN, McGraw J, Delaney KR, Steeves JD (1995).** Axonal regeneration and physiological activity following transection and immunological disruption of myelin within the hatchling chick spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 15(10):6963-74.
- Kim JE, Li S, GrandPré T, Qiu D, Strittmatter SM (2003).** Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron*, 38(2):187-99.
- Kim JE, Liu BP, Park JH, Strittmatter SM (2004).** Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron*, 44(3):439-51.
- Klinger M, Diekmann H, Heinz D, Hirsch C, Hannbeck von Hanwehr S, Petrusch B, Oertle T, Schwab ME, Stuermer CAO (2004a).** Identification of two nogo/rtn4 genes and analysis of Nogo-A expression in *Xenopus laevis*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 25(2):205-16.
- Klinger M, Taylor JS, Oertle T, Schwab ME, Stuermer CAO, Diekmann H (2004b).** Identification of Nogo-66 receptor (NgR) and homologous genes in fish. *Molecular Biology and Evolution*, 21(1):76-85.
- Lee JK, Kim JE, Sivula M, Strittmatter SM (2004).** Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 24(27):6209-17.
- 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. *The Journal of Neuroscience*, 19(17):7537-47.
- Lenzlinger PM, Shimizu S, Marklund N, Thompson HJ, Schwab ME, Saatman KE, Hoover RC, Bareyre FM, Motta M, Luginbuhl A, Pape R, Clouse AK, Morganti-Kossmann C, McIntosh TK (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):1047-56.

Li S, Liu BP, Budel S, Li M, Ji B, Walus L, Li W, Jirik A, Rabacchi S, Choi E, Worley D, Sah DWY, Pepinsky B, Lee D, Relton J, Strittmatter SM (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. *The Journal of Neuroscience*, 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 FPT, Schwab ME (2005). Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Annals of Neurology*, 58(5):706-19.

Liu BP, Fournier A, GrandPré T, Strittmatter SM (2002). Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*, 297(5584):1190-3.

Löw K, Culbertson M, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Tuszynski MH (2008). Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. *The Journal of Neuroscience*, 28(5):1099-108.

Marklund N, Bareyre FM, Royo NC, Thompson HJ, Mir AK, Grady MS, Schwab ME, McIntosh TK (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):844-53.

Marklund N, Morales D, Clausen F, Hånell A, Kiwanuka O, Pitkänen A, Gimbel DA, Philipson O, Lannfelt L, Hillered L, Strittmatter SM, McIntosh TK (2009). Functional outcome is impaired following traumatic brain injury in aging Nogo-A/B-deficient mice. *Neuroscience*, 163(2):540-51.

Masliah E, Xie F, Dayan S, Rockenstein E, Mante M, Adame A, Patrick CM, Chan AF, Zheng B (2010). Genetic deletion of Nogo/Rtn4 ameliorates behavioral and neuropathological outcomes in amyloid precursor protein transgenic mice. *Neuroscience*, 169(1):488-94.

Mathis C, Schröter A, Thallmair M, Schwab ME (2010). Nogo-A regulates neural precursor migration in the embryonic mouse cortex. *Cerebral Cortex*, 20(10):2380-90.

Matsukawa T, Arai K, Koriyama Y, Liu Z, Kato S (2004). Axonal regeneration of fish optic nerve after injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(4):445-51.

McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*, 13(4):805-11.

Meier S, Bräuer AU, Heimrich B, Schwab ME, Nitsch R, Savaskan NE (2003). Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(9):1153-5.

Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nature Neuroscience*, 7(3):221-8.

Miao RQ, Gao Y, Harrison KD, Prendergast J, Acevedo LM, Yu J, Hu F, Strittmatter SM, Sessa WC (2006). Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 103(29):10997-1002.

Mingorance A, Fontana X, Solé M, Burgaya F, Ureña JM, Teng FYH, Tang BL, Hunt D, Anderson PN, Bethea JR, Schwab ME, Soriano E, del Río JA (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, del Río JA (2007). Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cerebral Cortex*, 17(10):2375-86.

Montani L, Gerrits B, Gehrig P, Kempf A, Dimou L, Wollscheid B, Schwab ME (2009). Neuronal Nogo-A modulates growth cone motility via Rho-GTP/LIMK1/cofilin in the unlesioned adult nervous system. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(16):10793-807.

Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, Jaillard C, Barbin G, Boquet I, Love C, Jones EY, 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 (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1):47-60.

Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT (1994). A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*, 13(3):757-67.

Nath S, Agholme L, Kurudenkandy FR, Granseth B, Marcusson J, Hallbeck M (2012). Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of β -myloid. *The Journal of Neuroscience*, 32(26):8767-77.

Niederöst BP, Zimmermann DR, Schwab ME, Bandtlow CE (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 RA, Bandtlow CE (2002). Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *The Journal of Neuroscience*, 22(23):10368-76.

Oertle T, Klinger M, Stuermer CAO, Schwab ME (2003a). A reticular rhapsody: phylogenetic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10):1238-47.

Oertle T, Huber C, van der Putten H, Schwab ME (2003b). Genomic structure and functional characterisation of the promoters of human and mouse nogo/rtn4. *Journal of Molecular Biology*, 325(2):299-323.

Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, Huber AB, Simonen M, Schnell L, Brösamle C, Kaupmann K, Vallon R, Schwab ME (2003c). Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *The Journal of Neuroscience*, 23(13):5393-406.

O'Keefe J, Dostrovsky J (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1):171-5.

O'Neill P, Whalley K, Ferretti P (2004). Nogo and Nogo-66 receptor in human and chick: implications for development and regeneration. *Developmental Dynamics*, 231(1):109-21.

Park JB, 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):345-51.

Pernet V, Joly S, Christ F, Dimou L, Schwab ME (2008). Nogo-A and myelin-associated glycoprotein differently regulate oligodendrocyte maturation and myelin formation. *The Journal of Neuroscience*, 28(29):7435-44.

Petrinovic MM, Duncan CS, Bourikas D, Weinman O, Montani L, Schroeter A, Maerki D, Sommer L, Stoeckli ET, Schwab ME (2010). Neuronal Nogo-A regulates neurite fasciculation, branching and extension in the developing nervous system. *Development*, 137(15):2539-50.

Qiu J, Cai D, Filbin MT (2000). Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia*, 29(2):166-74.

Raiker SJ, Lee H, Baldwin KT, Duan Y, Shrager P, Giger RJ (2010). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 30(37):12432-45.

***Ramon y Cajal S (1928).** Degeneration and regeneration of the nervous system. *New York: Oxford University Press, American Branch*, Vol.1:396 and Vol.2:369-769.

Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ (1980). Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature*, 284(5753):264-5.

Ridley RM (1994). The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Progress in Neurobiology*, 44(2):221-31.

***Schnell L, Schwab ME (1990).** Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature*, 343(6255):269-72.

Schwab ME (2010). Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(12):799-811.

Schwab ME, Thoenen H (1985). Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *The Journal of Neuroscience*, 5(9): 2415-2423.

- Spillmann AA, Bandtlow CE, Lottspeich F, Keller F, Schwab ME (1998).** Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220). *The Journal of Biological Chemistry*, 273(30):19283-93.
- Syken J, GrandPre T, Kanold PO, Shatz CJ (2006).** PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science*, 313(5794):1795-800.
- Teng FYH, Tang BL (2008).** Cell autonomous function of Nogo and reticulons: The emerging story at the endoplasmic reticulum. *Journal of Cellular Physiology*, 216(2):303-8.
- VanGuilder HD, Farley JA, Yan H, Van Kirk CA, Mitschelen M, Sonntag WE, Freeman WM (2011).** Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiology of Disease*, 43(1):201-12.
- VanGuilder HD, Bixler GV, Sonntag WE, Freeman WM (2012).** Hippocampal expression of myelin-associated inhibitors is induced with age-related cognitive decline and correlates with deficits of spatial learning and memory. *Journal of Neurochemistry*, 121(1):77-98.
- Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, Mage R, Rader C, Giger RJ (2005).** The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *The Journal of Neuroscience*, 25(4):808-22.
- Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA (2006).** A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*, 124(3):573-86.
- Wang F, Cui H, Su Y, Zhao SG, Teng Y (2010).** Expression change of PirB in mice retina after optic nerve injury. *Molecular Medicine Reports*, 3(3):405-7.
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (2002a).** Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, 417(6892):941-4.
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (2002b).** P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 420(6911):74-8.
- Wang X, Chun SJ, Treloar H, Vartanian T, Greer CA, Strittmatter SM (2002).** 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.
- Willi R, Aloy EM, Yee BK, Feldon J, Schwab ME (2009).** Behavioral characterization of mice lacking the neurite outgrowth inhibitor Nogo-A. *Genes, Brain and Behavior*, 8(2):181-92.
- Willi R, Weinmann O, Winter C, Klein J, Sohr R, Schnell L, Yee BK, Feldon J, Schwab ME (2010).** Constitutive genetic deletion of the growth regulator Nogo-A induces schizophrenia-related endophenotypes. *The Journal of Neuroscience*, 30(2):556-67.
- Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM (2002).** A p75^{NTR} and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nature Neuroscience*, 5(12):1302-8.

Yee BK, Balic E, Singer P, Schwerdel C, Grampp T, Gabernet L, Knuesel I, Benke D, Feldon J, Mohler H, Boison D (2006). Disruption of glycine transporter 1 restricted to forebrain neurons is associated with a procognitive and antipsychotic phenotypic profile. *The Journal of Neuroscience*, 26(12):3169-81.

Yu J, Fernández-Hernando C, Suarez Y, Schleicher M, Hao Z, Wright PL, DiLorenzo A, Kyriakides TR, Sessa WC (2009). Reticulon 4B (Nogo-B) is necessary for macrophage infiltration and tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 106(41):17511-6.

Zagrebelsky M, Schweigreiter R, Bandtlow CE, Schwab ME, Korte M (2010). Nogo-A stabilizes the architecture of hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 30(40):13220-34.

Zhang L, Zheng S, Wu H, Wu Y, Liu S, Fan M, Zhang J (2009). Identification of BLYS (B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor. *The Journal of Neuroscience*, 29(19):6348-52.

Zheng B, Atwal J, Ho C, Case L, He XL, Garcia KC, 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 Science of the United States of America*, 102(4):1205-10.

Zhou Y, Qian R, Rao J, Weng M, Yi X (2010). Expression of PirB in normal and injured spinal cord of rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology – Medical Sciences*, 30(4):482-5.

Sekundární citace jsou označeny hvězdičkou (*).