

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lucie Sovíčková

Využití cerebrálních organoidů jako neurovývojového modelu schizofrenie
Cerebral organoids as a neurodevelopmental model of schizophrenia

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Kamila Weissová, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce za ochotu, trpělivost a poskytnuté rady a konzultace. Děkuji také své rodině a všem, kteří mě během celého studia podporovali.

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 Praze, 6. 5. 2021

Podpis

Abstrakt

Na rozvinutí schizofrenie se podílí genetické i environmentální faktory, které jsou zahrnuty v tzv. neurovývojovém modelu schizofrenie. Riziko vzniku schizofrenie zvyšuje např. prenatální stres, a to zřejmě v závislosti na pohlaví. Na neurovývojových abnormalitách schizofrenie se dále podílí receptor fibroblastových faktorů 1, který ovlivňuje vývoj kortexu a dopaminergních neuronů a zřejmě také působí na dysregulované geny u schizofreniků. Pro schizofrenii jsou také charakteristické abnormality cirkadiálních rytmů, osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny a spánku, které by mohly zvyšovat náchylnost k psychotickým stavům prostřednictvím dopaminového systému. Ukazuje se, že *Disc1*, který je považován za rizikový pro schizofrenii, se podílí na spánkových abnormalitách a buněčném cyklu radiálních glií. Pro další výzkum neurovývojového modelu schizofrenie se nabízí cerebrální organoidy, které jsou vytvářeny z lidských indukovaných pluripotentních buněk a napodobují vývoj lidského mozku. Tento model by v budoucnosti mohl být vylepšen vaskularizací a bioinženýrskými metodami.

Klíčová slova: cerebrální organoidy, schizofrenie, cirkadiální rytmy, stres, FGFR1, DISC1, glukokortikoidy

Abstract

The neurodevelopmental model of schizophrenia incorporates genetic and environmental factors, which both play a role in the development of this disorder. For example the risk of developing schizophrenia is increased by prenatal stress in a sex-dependant manner. Fibroblast growth factor receptor 1 plays a role in neurodevelopmental abnormalities and has been found to influence cortical development, development of dopaminergic neurons and genes dysregulated in schizophrenia. Circadian, hypothalamic–pituitary–adrenal axis and sleep abnormalities are also common in schizophrenia patients and they might increase susceptibility to psychosis via dopaminergic system. The schizophrenia susceptibility gene *Disc1* has been found to play a role in sleep abnormalities and regulation of radial glia cell cycle. Cerebral organoids, which are generated by using human induced pluripotent stem cells, model human brain development and could be used for further studies of neurodevelopmental model of schizophrenia. Cerebral organoids could be improved in the future by vascularization and bioengineering methods.

Key words: cerebral organoids, schizophrenia, circadian rhythms, stress, FGFR1, DISC1, glucocorticoids

Seznam použitých zkratek

Ach – acetylcholin (z angl. acetylcholine)

ACTH – adrenokortikotropní hormon (z angl. adrenocorticotropic hormone)

AKT – proteinkináza B (z angl. thymomas of AKR mice)

Ang – angiotensin

ANS – autonomní nervový systém

AVP – vazopresin (z angl. arginine vasopressin)

BMAL1 – mozkový a svalový protein podobný aryl uhlovodíkovému jadernému translokačnímu receptoru 1 (z angl. brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1)

BMP7 – kostní morfogenetický protein 7 (z angl. bone morphogenetic protein 7)

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát (z angl. cyclic-adenosine-monophosphate)

CBP – CREB (protein vázající se na cyklický adenosinmonofosfát responzivní element (z angl. cAMP response element binding protein)) vazebný protein (z angl. CREB-binding protein)

CLOCK – z angl. circadian locomotor output cycles kaput

CLOCK/BMAL1 – heterodimer proteinů CLOCK a BMAL1

CNS – centrální nervová soustava

CRH – kortikoliberin (z angl. corticotropin-releasing hormone)

CRY – z angl. Cryptochrome

D-box – DNA element

D2 receptor – dopaminový receptor D2

DAG – diacylglycerol

DISC1 – z angl. disrupted-in-schizophrenia-1

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)

E-box – z angl. enhancer box

ER – endoplazmatické retikulum

ErbB4 – receptor tyrosinproteinkinázy (z angl. receptor tyrosine-protein kinase Erb-B4)

ESCs – embryonální kmenové buňky (z angl. embryonic stem cells)

ETS – z angl. erythroblast transformation specific

FGF – fibroblastové růstové faktory (z angl. fibroblast growth factors)

FGFR – receptor fibroblastových růstových faktorů (z angl. fibroblast growth factor receptor 1)

FRS2 α – substrát receptoru fibroblastových růstových faktorů 2 α (z angl. FGF receptor substrate 2 α)

Gab1 – Grb2 asociovaný vazebný protein 1 (z angl. GRB2-associated-binding protein 1)

GABA – kyselina gama-aminomáselná (z angl. Gamma-aminobutyric acid)

GC – glukokortikoidy (z angl. glucocorticoids)

GR – glukokortikoidní receptor (z angl. glucocorticoid receptor)

Grb2 – protein vázající se na receptor růstových faktorů 2 (z angl. growth factor receptor-bound protein 2)

GRE – z angl. glucocorticoid response element

HPA – osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny (z angl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis)

HSP – protein teplotního šoku (z angl. heat shock protein)

HSPG – heparan sulfát proteoglykan (z angl. heparan sulfate proteoglycan)

Ig – imunoglobulinová doména (z angl. immunoglobulin domain)

iPSCs – indukované pluripotentní kmenové buňky (z angl. induced pluripotent stem cells)

kDa – kilodalton

MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkináza (z angl. mitogen-activated protein kinase)

MEK – proteinkináza MAP kinázy (z angl. mitogen-activated protein kinase kinase)

miRNA – mikroRNA

mRNA – mediátorová ribonukleotidová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)

NDE1 – z angl. nuclear distribution element 1

NDEL1 – z angl. NDE-like 1

nFGFR1 – jaderný receptor fibroblastových růstových faktorů 1 (z angl. nuclear fibroblast growth factor receptor 1)

NGF – nervový růstový faktor (z angl. nerve growth factor)

PER – z angl. Period

PER/CRY – heterodimer proteinů PER a CRY

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza (z angl. phosphoinositide 3-kinase)

PKC – proteinkináza C (z angl. protein kinase C)

PLC γ – fosfolipáza C γ (z angl. phospholipase C γ)

POMC – proopiomelanokortin (z angl. pro-opiomelanocortin)

PVN – paraventrikulární jádro (z angl. paraventricular nucleus)

PY – fosfotyrosin (z angl. phosphotyrosine)

RA – kyselina retinová (z angl. retinoic acid)

RAF – z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma

RAR – receptor kyseliny retinové (z angl. retinoic acid receptor)

RAS – z angl. rat sarcoma

REM – fáze spánku s „rychlými pohyby očí“ (z angl. rapid eye movement)

REV-ERB – sirotčí jaderný receptor (z angl. orphan nuclear receptor from the reverse erythroblastosis virus)

RNA – ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)

ROR – kyselině retinové příbuzný sirotčí receptor (z angl. retinoic acid receptor-related orphan receptor)

RORE – ROR-vazebné elementy (z angl. ROR response element)

RSK1 – ribozomální S6 kináza 1 (z angl. ribosomal S6 kinase)

SCN – suprachiasmatická jádra (z angl. suprachiasmatic nuclei)

SOS – z angl. son of sevenless

SOX2 – SRY-box transkripční faktor 2 (z angl. SRY (sex determining region Y)-box 2)

STAT – dráha signálních transduktorů a aktivátorů transkripce (z angl. signal transducer and activator of transcription)

SVZ – subventrikulární zóna (z angl. subventricular zone)

TK – tyrosinkinázová doména (z angl. tyrosine kinase domain)

TUJ1 – β -tubulin třídy III (z angl. neuron-specific class III β -tubulin)

vit D – vitamin D

Obsah

Úvod	1
1. Schizofrenie jako neurovývojové onemocnění	2
1.1 Neurovývojový model	2
1.2 Role FGF signální dráhy u neurovývojového modelu schizofrenie	3
1.3 Vliv prenatálního stresu	7
2. Cirkadiální rytmy a stres (role glukokortikoidů)	9
2.1 Cirkadiální rytmy	9
2.2 Interakce mezi glukokortikoidním a cirkadiálním systémem	11
2.3 Narušení cirkadiálních rytmů u schizofrenie	12
2.4 Role DISC1 v regulaci spánku	13
3. Cerebrální organoidy jako nový model neurovývojových onemocnění	14
3.1 Výzkumy na cerebrálních organoidech relevantní pro neurovývojový model schizofrenie	16
3.1.1 Vliv nFGFR1 na vývoj kortexu	16
3.1.2 Studie DISC1	16
3.1.3 Studium prenatálního stresu	17
3.2 Validita a limitace modelu	17
Závěr	19
Seznam použité literatury	20

Úvod

Schizofrenie je vážné psychiatrické onemocnění, které výrazně narušuje fungování jedince ve společnosti a až desetkrát zvyšuje riziko sebevraždy (Chesney et al., 2014). Pro schizofrenii zatím neexistuje léčba, která by efektivně cílila na všechny symptomy, mezi které patří psychotické stavy, poruchy motivace a kognitivní poruchy (Owen et al., 2016). Schizofrenie je velice komplexní a na jejím vzniku se podílí mnoho genetických i environmentálních faktorů. Nejlépe tuto skutečnost vysvětluje tzv. neurovývojový model, podle kterého je příčinou schizofrenie abnormální vývoj mozku (Rapoport et al., 2012). Z hlediska vlivu na vývoj mozku u schizofrenie byly studovány např. fibroblastové růstové faktory a prenatální stres.

Pro výzkum schizofrenie byly zatím využívány převážně zvířecí modely a *post mortem* studie. Ty však neumožňují výzkum vývoje lidského mozku a bližší pochopení neurovývojových mechanismů vedoucích ke vzniku schizofrenie. Jako nadějný model se ukazují být cerebrální organoidy, třidimenzionální struktury získané z lidských indukovaných pluripotentních buněk, které napodobují vývoj lidského mozku.

Cílem práce je zaměřit se na vybrané aspekty neurovývojového modelu schizofrenie, jako je prenatální stres a fibroblastové růstové faktory. Dále nastínit souvislost stresu a schizofrenie s cirkadiánními rytmy a nakonec zhodnotit využití cerebrálních organoidů ke studii neurovývojového modelu schizofrenie.

1. Schizofrenie jako neurovývojové onemocnění

1.1 Neurovývojový model

Schizofrenie je závažné komplexní duševní onemocnění (Owen et al., 2016), které během života postihne přibližně sedm z 1000 jedinců (McGrath et al., 2008). Projevuje se tzv. pozitivními a negativními symptomy a bývá doprovázena kognitivními i afektivními poruchami. Mezi pozitivní symptomy (tzv. psychózy) patří zejména halucinace a přeludy, do negativních se řadí poruchy motivace, pokles spontánního mluveného projevu a stranění se společnosti (Owen et al., 2016).

Schizofrenie má vysokou míru heritability. Důkazem je např. vyšší riziko výskytu schizofrenie u příbuzných prvního stupně než u příbuzných druhého stupně (Kendler & Gardner, 1997). Schizofrenie je vysoce polygenní (Owen et al., 2016). V celogenomové asociační studii bylo popsáno 108 lokusů spojených s výskytem schizofrenie (Ripke et al., 2014). Dále byly nalezeny geny spojené se schizofrenií, např. určité haplotypy v lokusu genu *Neuregulin1* (Stefansson et al., 2002) a alelické varianty genu *Disc1* (z angl. disrupted-in-schizophrenia-1) (Callicott et al., 2005). Jednotlivé varianty genů však představují pouze malé riziko pro vznik schizofrenie a onemocnění je spíše způsobeno kombinací různých genových variant (Muraki & Tanigaki, 2015).

Schizofrenie není určena pouze geny, ale na jejím rozvinutí se podílí i environmentální faktory (Lewis & Levitt, 2002). Důkazem je např., že 89 % pacientů nemá ani jednoho rodiče schizofrenika nebo že schizofrenie se v průměru nerozvine u 87 % dětí schizofreniků (Gottesman & Erlenmeyer-Kimling, 2001). Velké množství environmentálních faktorů působí zejména během prenatálního a perinatálního období a patří mezi ně např. prenatální maternální infekce, podvýživa a stres a obsterické komplikace. Tyto faktory výrazně ovlivňují vývoj mozku již v prenatálním období a jsou jedním z podkladů tzv. neurovývojového modelu schizofrenie. Projevy schizofrenie jsou nejčastěji popisovány až v adolescenci a rané dospělosti (mezi 20-30 rokem), kdy dochází k finální maturaci mozku. Některé behaviorální odchylky lze pozorovat i v dětství. Neurovývojový model popisuje subtyp schizofrenie, pro který jsou typické pre či perinatálně vzniklé neurovývojové abnormality (Lewis & Levitt, 2002).

Neurovývojový model předpokládá, že u pacientů, u kterých se později rozvine schizofrenie, dochází k vývojovým abnormalitám mozku dávno před nástupem onemocnění. U pacientů se schizofrenií byl sledován úbytek kortikální šedé mozkové hmoty, abnormality integrity bílé mozkové hmoty hlavně v prefrontálním kortexu, zvětšené mozkové komory, poruchy synaptické konektivity (Rapoport et al., 2012) a abnormální cytoarchitektura

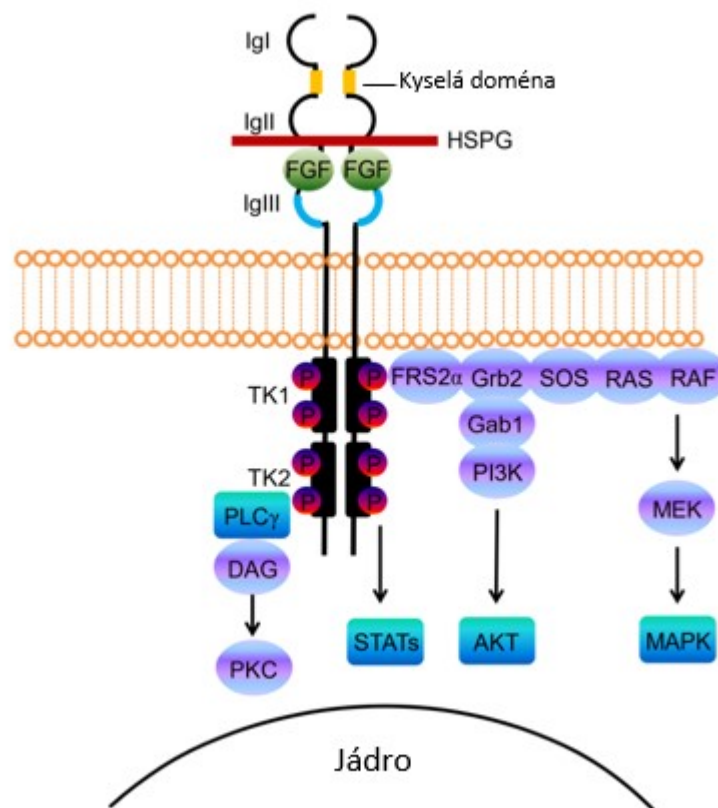
v entorhinálním kortexu (Arnold et al., 1997). Jelikož nebyly nalezeny žádné neurodegenerativní procesy, předpokládá se, že abnormality vznikají v důsledku poruch migrace nervových buněk, arborizace a funkce synapsí, což je v souladu s neurovývojovým modelem. Poruchy v neuronální migraci jsou často spojovány s abnormální distribucí buněk např. v prefrontálním kortexu, thalamu, hypothalamu, amygdale a hipokampu a poruchou v distribuci a hustotě GABA interneuronů (Schmidt & Mirnics, 2015). Kromě abnormalit spojených s GABAergní neurotransmisí je se schizofrenií spojená porucha i dalších neurotransmitterových systémů, a to konkrétně glutamátergního a dopaminergního (Catts et al., 2013), přičemž zejména dopaminergní hyperaktivita ve striatu je pravděpodobně podkladem iniciace psychotických stavů schizofreniků (Howes & Kapur, 2009).

Některé geny, jejichž varianty byly popsány jako rizikové pro schizofrenii, jsou zapojené i v regulaci migrace neuronů. Mezi takové geny patří např. *Neuregulin1*, *ErbB4* a *Reelin* (Muraki & Tanigaki, 2015). V průběhu prenatálního i postnatálního vývoje mozku putují GABAergní interneurony tangenciálně z ventrální subventrikulární zóny (SVZ, z angl. subventricular zone) do kortexu. Pyramidální neurony migrují radiálně pomocí radiálních glií z dorzální SVZ a migrace je dokončena během 23. týdne gestačního věku (Catts et al., 2013). Radiální migrace je ovlivněná poruchami v *Neuregulin1* signalizaci, která způsobuje předčasnou diferenciaci radiálních glií na astrocyty (Schmid et al., 2003). Geny *Discl* a *Neuregulin1* jsou dále spojeny s neurogenézí (Catts et al., 2013), která je u schizofreniků v hipokampu redukována (Reif et al., 2006).

1.2 Role FGF signalizační dráhy u neurovývojového modelu schizofrenie

Fibroblastové růstové faktory (FGF, z angl. fibroblast growth factors) jsou důležitými signály při vývoji centrální nervové soustavy (CNS) a účastní se i neurogeneze, růstu axonů, diferenciaci, regenerace a přežívání neuronů. Signalizační dráha je tvořena receptory fibroblastových růstových faktorů (FGFR, z angl. fibroblast growth factor receptor), které se skládají ze tří extracelulárních domén, transmembránové domény a dvou cytosolických tyrosinkinázových domén. Po vazbě ligandu (FGF) dojde k dimerizaci extracelulárních domén dvou FGFR propojených molekulou heparan sulfát proteoglykanu, který se váže na kyselou doménu („acidic domain“) FGFR. To následně vede k autofosforylaci tyrosinových zbytků na cytosolických doménách (Reuss & von Bohlen und Halbach, 2003). Signál se dále přenáší pomocí dráhy mitogenem aktivované proteinkinázy, signální dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy a proteinkinázy-B, dráhy STAT (z angl. signal transducer and activator of transcription) a fosfolipázy C γ , čímž je regulována transkripce genů (Talaie et al., 2020) (viz Obrázek 1). Ze

všech FGF byly nejvíce studované FGF1 a FGF2, které jsou exprimovány při vývoji mozku i v maturovaném CNS (Reuss & von Bohlen und Halbach, 2003).

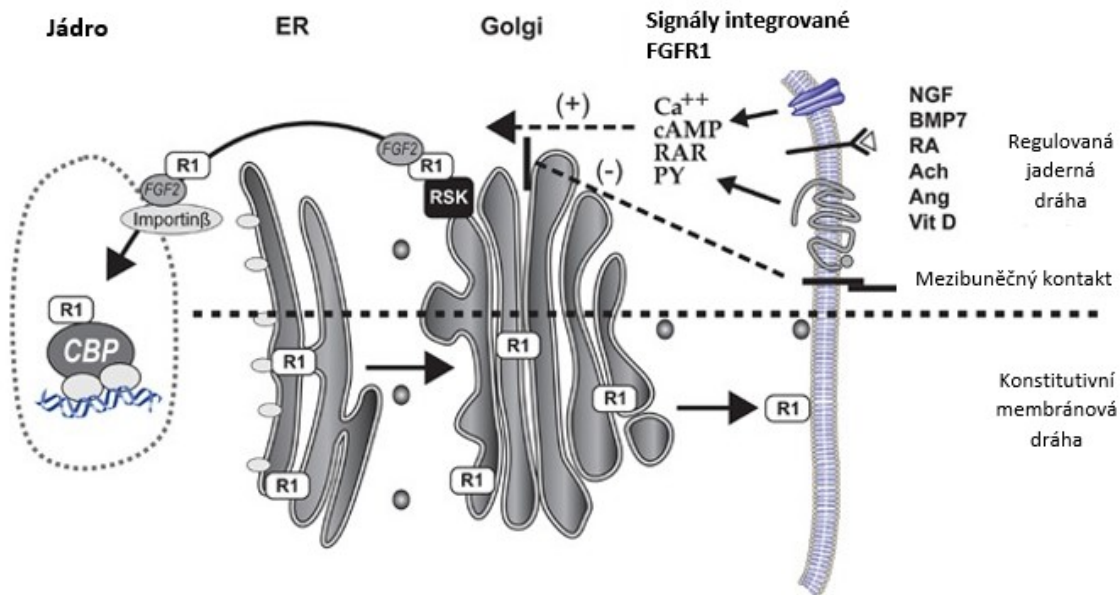


Obrázek 1: Receptor fibroblastových růstových faktorů (FGFR). FGFR se skládá ze tří extracelulárních imunoglobulinových domén (IgI, IgII, IgIII), kyselých domén, transmembránových domén a dvou cytosolických tyrosinkinázových domén (TK1, TK2). Komplex FGF/FGFR zahrnuje dvě molekuly receptoru, dvě molekuly FGF a jeden řetězec heparan sulfát proteoglykanu (HSPG). Signální transdukce aktivuje signální dráhy: RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT, STAT a PLC γ . FGF – fibroblastový růstový faktor. FRS2 α – substrát receptoru fibroblastových růstových faktorů 2 α . Grb2 – protein vázající se na receptor růstových faktorů 2. Gab1 – Grb2 asociovaný vazebný protein 1. PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza. AKT – proteinkináza B. SOS – adaptorový protein, z angl. son of sevenless. RAS – malý G protein, z angl. rat sarcoma. RAF – proteinkináza, z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma. MEK – proteinkináza MAP kinázy. MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkináza. STATs – transduktory signálu a aktivátory transkripce. PLC γ – fosfolipáza C γ . DAG - diacylglycerol. PKC – proteinkináza C (upraveno podle Astolfi et al., 2020).

FGF2 je neurotrofní faktor nacházející se v neuronech a gliových buňkách v CNS. Reguluje např. neurogenezi v hipokampu, formování synapsí, reakci na poškození, paměť a myelinizaci (Talaei et al., 2020). V séru léčených schizofreniků byla naměřena vyšší hladina FGF2 než u kontrol a u neléčených schizofreniků hladina FGF2 pozitivně korelovala se závažností negativních příznaků. Dále byla nalezena negativní korelace mezi hladinou FGF2 a věkem propuknutí příznaků schizofrenie, tedy čím nižší věk, tím bylo více sérového FGF2. Tento vztah může ukazovat na abnormální hladiny FGF2 během vývojové fáze nervové soustavy, což odpovídá neurovývojovému modelu schizofrenie (Hashimoto et al., 2003).

FGFR1 je receptor vázající FGF2 a účastní se regulace růstu nervů, proliferace neuronálních progenitorových buněk a dlouhodobé potenciace (long-term potentiation) (Talaei et al., 2020). Na úrovni DNA byl nalezen jednonukleotidový polymorfismus upstream od genu pro FGFR1, který byl asociován se schizofrenií (Shi et al., 2011). Ve studiu *post mortem* byla dále nalezena zvýšená hladina FGFR1 mRNA v hipokampální oblasti (Gaughran et al., 2006).

Kromě membránové formy existuje i jaderná forma FGFR1 (nFGFR1), která převažuje v diferencujících se buňkách a má odlišný mechanismus přenosu signálu. Po stimulaci buňky (např. růstovými faktory, hormony, neurotransmitery) dojde k transportu nově nasyntetizovaného nFGFR1 z pre-Golgiho membrány do cytosolu a pomocí importinu- β do jádra. Následně nFGFR1 rozloží inaktivní komplex transkripčního koaktivátoru CREB (z angl. cAMP response element binding protein) vazebného proteinu (CBP, z angl. CREB-binding protein) a ribozomální S6 kinázy 1 (RSK1) tím, že se naváže na CBP. Komplex nFGFR1 a CBP interaguje s různými transkripčními faktory, rekrutuje RNA polymerázu II a acetyluje histony, čímž aktivuje genovou transkripci. Jiná molekula nFGFR1 se naváže na RSK1 a tento komplex fosforyluje transkripční faktory (Fang et al., 2005; Stachowiak & Stachowiak, 2016). RSK1 interaguje s nFGFR1 i v cytosolu a zvyšuje jeho mobilitu, čímž napomáhá jeho transportu do jádra (Dunham-Ems et al., 2006) (viz Obrázek 2).



Obrázek 2: Konstitutivní membránový a regulovaný jaderný transport FGFR1 (R1). Nově syntetizovaný FGFR1 může vstoupit do konstitutivní membránové nebo regulované jaderné dráhy. U membránové dráhy je FGFR1 glykosylován v Golgiho aparátu (Golgi) a transportován do cytoplazmatické membrány. U jaderné dráhy je nově nasyntetizovaný FGFR1 uvolněn z pre-Golgiho membrány do cytosolu a pomocí importinu- β je transportován do jádra (tento proces je usnadněn pomocí FGF2 a ribozomální S6 kinázy (RSK)), kde interaguje s CBP a reguluje transkripci. Akumulace jaderné formy FGFR1 je stimulována různými signály, jako jsou růstové faktory (NGF, BMP7), vitamin D (vit D), retinoidy, hormony, neurotransmitery, vápník (Ca^{++}) a cyklické AMP (cAMP). Akumulace je inhibována kontaktem receptorů sousedních buněk. ER – endoplazmatické retikulum. CBP – CREB vazebný protein. NGF – nervový růstový faktor. BMP7 - kostní morfogenetický protein 7. RA – kyselina retinová. Ach – acetylcholin. Ang - angiotensin. RAR – receptor kyseliny retinové. PY – fosfotyrosin (upraveno podle Stachowiak & Stachowiak, 2016).

FGF2 se vyskytuje ve dvou izoformách a to nízkomolekulární 18kDa a vysokomolekulární 23kDa izoformě, která obsahuje jaderný lokalizační signál. nFGFR1 váže specificky pouze 23kDa FGF2, který je s nFGFR1 kotransportován do jádra, napomáhá mobilitě nFGFR1 a koaktivuje transkripci (Dunham-Ems et al., 2009; Stachowiak & Stachowiak, 2016). nFGFR1 se váže na promotory genů pro mRNA i miRNA (Terranova et al., 2015).

nFGFR1 stimuluje diferenciaci pluripotentních a neuroprogenitorových buněk do neurálních buněčných typů a zároveň inhibuje jejich proliferaci (Fang et al., 2005; Stachowiak & Stachowiak, 2016). nFGFR1 se podílí také na neurogenezi v SVZ, jak ukázali Stachowiak et al. (2009). Silikonové nanočástice s DNA plazmidem kódujícím nFGFR1 byly přeneseny do progenitorových buněk v SVZ mozku dospělých myší. Akumulace nFGFR1 v jádře způsobila diferenciaci progenitorových buněk na neurony (Stachowiak et al., 2009). Neurogeneze se ale liší u různých živočišných druhů a u lidí zatím nebyla neurogeneze v SVZ při schizofrenii dostatečně studována (Weissleder et al., 2019).

Narla et al. (2017) navrhuje, že narušená signální dráha nFGFR1 by mohla být jedním z faktorů zodpovědných za neurovývojovou patologii schizofrenie. Výzkum pomocí indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSCs, z angl. induced pluripotent stem cells) získaných od pacientů se schizofrenií ukázal, že 84 % genů, které byly u pacientů dysregulované, obsahují promotor vázající nFGFR1. nFGFR1 se vázal na určité geny pro mRNA (např. *Disc1*) více než u kontrol. Dále bylo u pacientů nalezeno 16 upregulovaných miRNA a na promotor pěti z nich se také vázal nFGFR1 (Narla et al., 2017).

V primárních neuronálních embryonálních buněčných kulturách bylo prokázáno, že FGF2 stimuluje proliferaci dopaminergních neuronů (Bouvier & Mytilineou, 1995). FGF tedy figurují při vývoji dopaminergního systému, jehož abnormality přispívají k patologii schizofrenie (Stachowiak et al., 2013). Role FGFR1 signalizace v dopaminergních neuronech byla studována na transgenních myších s vloženým dominantně negativním *FGFR1(TK-)* genem fúzovaným s promotorem tyrosinhydroxylázy (Klejbor et al., 2006). Proteinový produkt genu *FGFR1(TK-)* tvoří nefunkční komplexy s FGFR, čímž blokuje jejich signalizaci (Ueno et al., 1992). V takto homozygotně transgenních myších byla tedy antagonizována signalizace FGFR1 specificky v dopaminergních neuronech. Oproti kontrolám měly novorozené transgenní myši sníženou hustotu a velikost tyrosinhydroxyláz-imunoreaktivních neuronů v *substantia nigra compacta* (tam byla snížená hustota zachována i v dospělosti) a ve ventrální tegmentální oblasti. Spolu se sníženou hustotou dopaminového transportéru (nachází se na presynaptické membráně a reguluje přenos dopaminu) ve striatu toto naznačuje, že došlo

k úbytku nigrostriálních neuronů. Na druhou stranu byla v transgenních zvířatech zvýšená hladina dopaminu ve striatu. Podle autorů by tato upregulace dopaminu mohla být spojena s nedostatečně vyvinutými dopaminergními neurony. Dále byla u mutantních myší naměřená snížená prepulsní inhibice (Klejbor et al., 2006), která je zhoršená i u schizofreniků a mohla by souviset s poruchami senzomotorických vstupů (Swerdlow et al., 1994).

1.3 Vliv prenatálního stresu

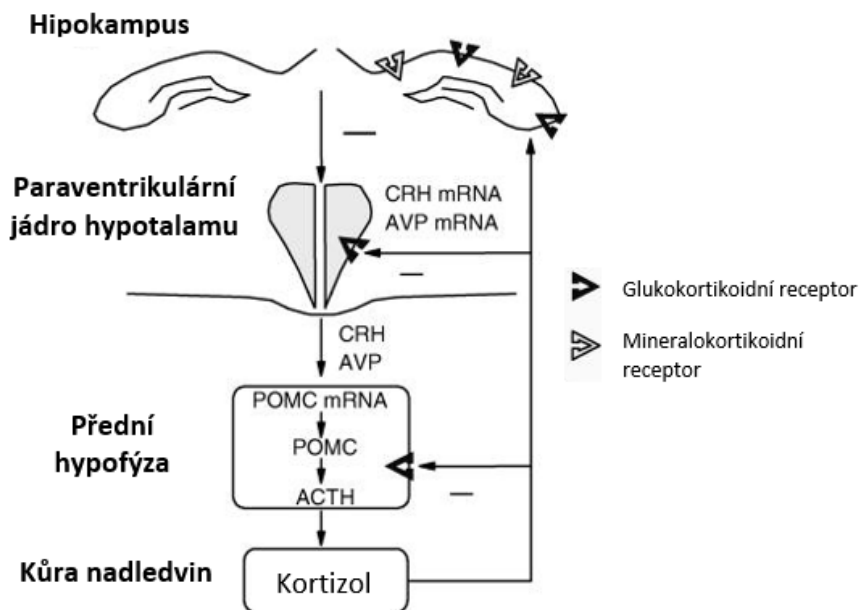
Prenatální stres a obsterické komplikace (hypoxie plodu, preeklampsie, snížený růst plodu) byly v řadě studií spojené se zvýšeným rizikem vzniku schizofrenie. Bylo zkoumáno mnoho odlišných stresorů, jak ekologických (hladomor, válka, přírodní katastrofy), tak i individuální stres nebo vliv prenatálních infekcí. Pravděpodobně se na riziku dohromady podílí souhra různých pre- a postnatálních faktorů, jako je pohlaví plodu, genetické pozadí, doba vystavení stresu a další environmentální faktory (Lipner et al., 2019).

Produkce FGF2 je mimo jiné také regulována stresem a glukokortikoidy (GC). Akutní stres omezením pohybu („restraint stress“) způsobil zvýšení exprese FGF2 v hipokampu a prefrontálním kortexu u potkanů. Prenatální vystavení kortikosteronu snížilo množství FGF2 mRNA v hipokampu u dospělých potkaních samců a způsobilo méně výraznou upregulaci FGF2 po akutním stresu. Podle Molteni et al. by krátkodobé zvýšení exprese FGF2 mohlo sloužit jako ochrana proti dlouhodobým následkům stresu a GC a jedinci vystavení prenatálnímu stresu by mohli být v dospělosti vůči stresu více zranitelní (Molteni et al., 2001). Nedávná studie myší s vyřazeným FGF2 genem však zvýšenou citlivost ke stresu ani zvýšené úzkostné chování neprokázala. Autoři však zdůrazňují, že výsledky studie se mohou lišit u různých zvířecích modelů (Hövel et al., 2019).

Kortizol a prenatální stres mohou dlouhodobě ovlivnit osu hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA, z angl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis) (Kapoor et al., 2006). HPA se účastní reakce na stres a udržování homeostázy (McGowan & Matthews, 2018). Zahrnuje paraventriculární jádro (PVN, z angl. paraventricular nucleus) v hypotalamu, které integruje vstupy např. z ostatních částí hypotalamu a limbického systému (Ferguson et al., 2008). Obsahuje těla parvocelulárních neurosekrečních buněk, které při stresové reakci produkují kortikoliberin a vazopresin a uvolňují je do hypofyzárního portálního oběhu (Ferguson et al., 2008; Kapoor et al., 2006; McGowan & Matthews, 2018). Tyto hormony dále stimulují buňky přední hypofýzy k produkci a uvolnění adrenokortikotropního hormonu do krevního oběhu. Adrenokortikotropní hormon působí na buňky kůry nadledvin, což vede k produkci GC, u lidí hlavně kortizolu (McGowan & Matthews, 2018). GC se vážou na glukokortikoidní receptory

(GR), které po vazbě ligandu translokují do jádra, kde působí jako transkripční faktory (Tsigos & Chrousos, 2002). HPA je regulována negativní zpětnou vazbou pomocí vazby GC na GR a mineralokortikoidní receptory v hypotalamu, hypofýze a hipokampu (Walker et al., 2008) (viz Obrázek 3).

Bylo zjištěno, že schizofrenici mají větší reaktivitu HPA a trvale zvýšenou hladinu kortizolu (Walker et al., 2008). To by mohlo být zapříčiněno prenatálním stresem. Ve studii na potkaních, kde byly březí samice vystavené různorodým stresorům, měli dospělí samci delší reakci (déle trvající zvýšenou hladinu GC) na akutní stres (Koenig et al., 2005). Dále bylo u mláďat stresovaných potkaních samic nalezeno snížené množství GR v hipokampu (Barbazanges et al., 1996) a u schizofreniků byla v hipokampu nalezena snížená exprese mRNA pro GR. Nižší množství GR v hipokampu by mohlo souviset s poruchou regulace HPA a zvýšenou hladinou GC. Dlouhodobě zvýšená hladina GC působí neurotoxicky zejména na hipokampus, který je u schizofreniků redukován. Navíc aktivita HPA se přirozeně zvyšuje v období puberty a adolescence, což je období, kdy se u schizofreniků začínají projevovat behaviorální odchylky předcházející nástupu psychóz (Walker et al., 2008).



Obrázek 3: Osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Parvocelulární neurosekreční buňky v paraventrikulárním jádru hypotalamu sekretují kortikoliberin (CRH) a vazopresin (AVP), které stimuluje syntézu proopiomelanokortinu (POMC, prekurzor ACTH) a uvolnění adrenokortikotropního hormonu (ACTH) z kortikotropních buněk přední hypofýzy. ACTH poté způsobí produkci a uvolnění kortizolu z kůry nadledvin. Glukokortikoidy regulují vlastní syntézu pomocí vazby na glukokortikoidní a mineralokortikoidní receptory v limbickém systému a na glukokortikoidní receptory v paraventrikulárním jádru hypotalamu a přední hypofýze (upraveno podle Kapoor et al., 2006).

Ve studii vlivu maternálního prenatálního psychosociálního stresu na riziko schizofrenie byl stres měřen pomocí rozhovorů s matkami během těhotenství. Zatímco celkově u potomků

nebyl prokázán vztah mezi prenatálním stresem a rizikem rozvoje schizofrenie, u potomků mužského pohlaví se tento vztah potvrdil. Chronický stres matky u chlapců až dvojnásobně zvyšoval riziko rozvoje schizofrenie. Ukazuje se tedy, že vliv prenatálního stresu na rozvoj schizofrenie je pohlavně závislý (Fineberg et al., 2016). V nedávné studii hladiny kortizolu u těhotných matek bylo zjištěno, že vyšší hladina kortizolu v třetím trimestru byla spojena se sníženým růstem mužských plodů, u kterých se v dospělosti rozvinula schizofrenie. U kontrol a ženských plodů tato asociace nebyla (Ellman et al., 2019).

Wilson et al. (2020) ve své studii popisují, že prenatální podání malé dávky testosteronu březím myším samicím vedlo ke snížené odpovědi na akutní stres omezením pohybu u samčích potomků. U samic tento efekt pozorován nebyl (Wilson et al., 2020). Ve studii lidských plodů bylo ukázáno, že fetální testosteron pozitivně koreluje s hladinou kortizolu. Zdá se tedy, že prenatální stres by mohl zvyšovat hladiny testosteronu (Gitau et al., 2005) a i malé zvýšení testosteronu během těhotenství by mohlo u mužů vést ke zvýšenému riziku výskytu onemocnění souvisejících s regulací stresu (Wilson et al., 2020).

Roli v odlišném působení prenatálního stresu by mohla hrát placenta, která se liší svou velikostí i expresí genů u obou pohlaví plodu (Bronson & Bale, 2016). Enzym 11 β -hydroxysteroiddehydrogenáza 2, který konvertuje aktivní kortizol na neaktivní kortizon (Tomlinson & Stewart, 2001), vykazuje nižší aktivitu v placentě plodů mužského pohlaví (Stark et al., 2009). Dále byla v celogenomové asociční studii nalezena skupina genů spojených se schizofrenií, které interagují s komplikacemi v raném věku. Tyto geny byly ve velké míře exprimovány v placentě a specificky upregulovány u plodů mužského pohlaví (Ursini et al., 2018).

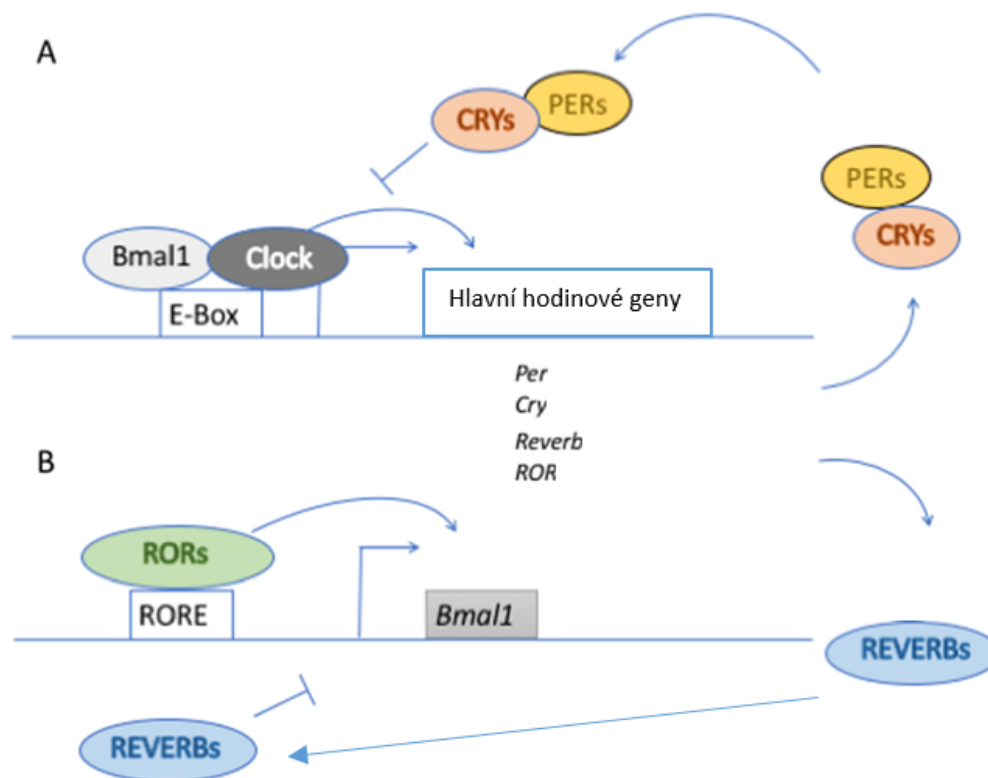
2. Cirkadiánní rytmy a stres (role glukokortikoidů)

2.1 Cirkadiánní rytmy

Cirkadiánní rytmy je systém sloužící k přizpůsobení chování a fyziologických funkcí přibližně 24 hodinové časové periodě (Dibner et al., 2009). Cirkadiánní rytmy kontrolují např. cykly spánku/bdění, metabolismus, kardiovaskulární, endokrinní a imunitní systém (Sarlus et al., 2019). Vnější podněty (např. světlo) jsou důležité pro synchronizaci cirkadiánních rytmů, ale cirkadiánní rytmy jsou schopné přetrvávat i bez nich (Cox & Takahashi, 2019). Hlavní roli v řízení cirkadiánních rytmů mají suprachiasmatická jádra (SCN, z angl. suprachiasmatic nuclei), což je párová struktura v hypotalamu nacházející se nad optickým chiasmatem. Světelné informace z retiny jsou retinohypotalamickou dráhou přeneseny do SCN, kde seřizují expresi hodinových genů ve specifických neuronech SCN, které následně synchronizační signál

předávají do celé jeho struktury. Signál je dále přenesen nervovými a endokrinními regulačními dráhami do ostatních částí mozku i do periferních orgánů jako jsou např. játra a ledviny (Dibner et al., 2009).

Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin spočívá v transkripčních zpětnovazebných smyčkách, které regulují rytmickou expresi hodinových genů. Hlavní smyčka zahrnuje heterodimer proteinů CLOCK (z angl. circadian locomotor output cycles kaput) a BMAL1 (z angl. brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1), který obsahuje základní helix-smyčka-helix doménu, kterou se váže na E-box na DNA. Tím je aktivována transkripce dalších hodinových genů, jako jsou *Period 1 (Per1)*, *Per2*, *Cryptochrome 1 (Cry1)*, *Cry2*, *Reverba* (z angl. orphan nuclear receptor from the reverse erythroblastosis virus) a *Rora* (z angl. retinoic acid receptor-related orphan receptor α) (Cox & Takahashi, 2019; Sarlus et al., 2019). Proteiny PER a CRY pomalu přibývají během dne a večer tvoří heterodimer, který translokuje do jádra, kde interaguje s CLOCK/BMAL1 a inhibuje transkripce genů aktivovanou komplexem CLOCK/BMAL1. Tím PER a CRY inhibují i vlastní transkripce. Během noci jsou proteiny PER a CRY fosforylovány a degradovány, čímž klesne jejich množství a komplex CLOCK/BMAL1 začne nový cyklus transkripce. Tato smyčka trvá přibližně 24 hodin a zajišťuje cirkadiální oscilaci komplexů CLOCK/BMAL1 a PER/CRY (Cox & Takahashi, 2019; Koike et al., 2012). Ve vedlejší smyčce figuruje proteiny ROR a REV-ERB, které kompetují o vazbu na ROR-vazebné elementy na genu *Bmal1*. Zatímco ROR proteiny pozitivně regulují transkripce genu *Bmal1*, proteiny REV-ERB transkripce inhibují. Komplex CLOCK/BMAL1 rytmicky aktivuje transkripce genů pro REV-ERB proteiny a tím dochází k cirkadiální oscilaci proteinu BMAL1. Ve třetí smyčce CLOCK/BMAL1 aktivuje transkripce transkripčních faktorů (např. D-box vazebného proteinu), které se vážou na D-box elementy některých hodinových genů (Cox & Takahashi, 2019; Sarlus et al., 2019) (viz Obrázek 4).



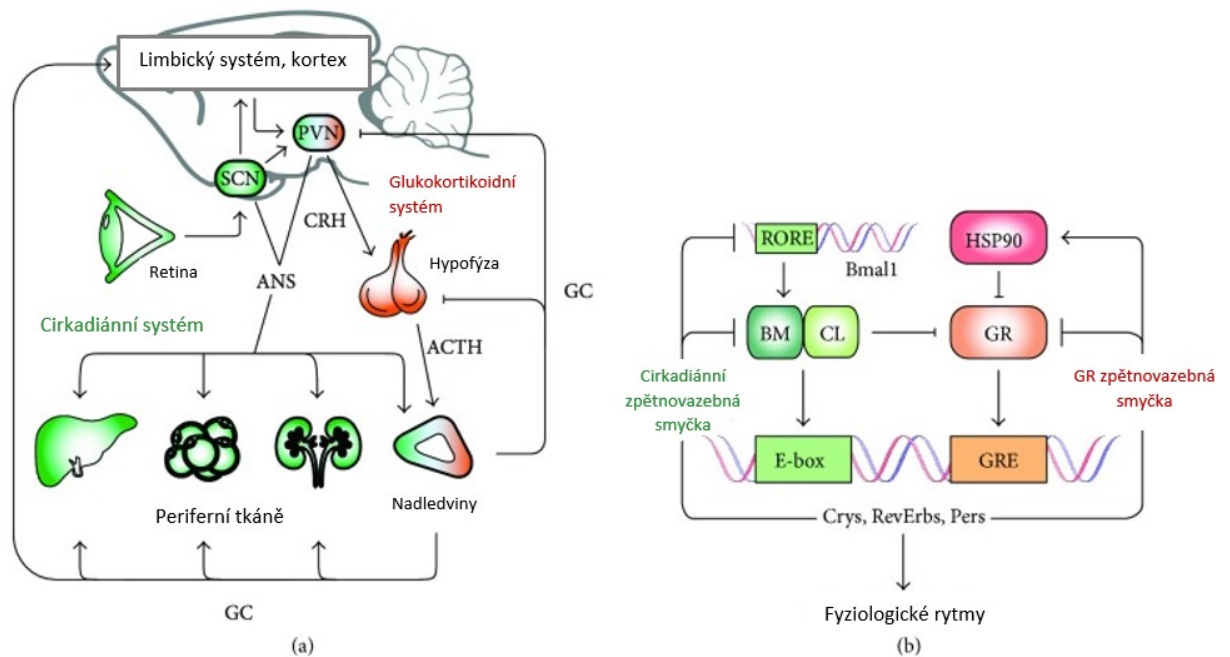
Obrázek 4: Molekulární mechanismus hodinových genů. (A) Hlavní smyčka: Komplex CLOCK/BMAL1 se váže na E-box na DNA, čímž aktivuje transkripci *Per*, *Cry*, *Reverb* a *Ror*. Proteiny *PER* a *CRY* vytvoří represorový komplex, který inhibuje transkripci genů řízenou CLOCK/BMAL1, včetně *Per* a *Cry*. Hladina *PER* a *CRY* následně klesne, čímž je uvolněn komplex CLOCK/BMAL1 a je umožněn nový cyklus genové exprese. (B) Vedlejší smyčka: *ROR* se váže na *RORE* (*ROR*-vazebné elementy) a aktivuje transkripci *Bmal1*. *REV-ERB* se váže na stejný vazebný element a transkripci *Bmal1* inhibuje (upraveno podle Sarlus et al., 2019).

2.2 Interakce mezi glukokortikoidním a cirkadiálním systémem

GC se řídí cirkadiálními rytmy a jejich hladina je nejvyšší na začátku aktivní fáze a nejnižší na začátku inaktivní fáze. Cirkadiální systém reguluje výlev GC působením na HPA pomocí eferentní dráhy vedoucí ze SCN do PVN a také ovlivňováním citlivosti kůry nadledvin na adrenokortikotropní hormon (Nader et al., 2010).

Za vyšší koncentrace GC během stresové odpovědi nebo při cirkadiálním vrcholu, jsou aktivovány GR, které disociují z proteinů teplotního šoku (HSP, z angl. heat shock protein), translokují do jádra, kde se vážou na glukokortikoid zodpovědné části (GRE, z angl. glucocorticoid response element) a regulují transkripci (Astiz & Oster, 2018). Promotory některých hodinových genů obsahují GRE, což umožňuje GC ovlivňovat expresi hodinových genů (Nader et al., 2010). GC mohou posunout fázi exprese hodinových genů v periferních orgánech (např. v játrech, ledvinách a srdci), jak bylo ukázáno pomocí injekce GC (dexametazonu) do myši. Jelikož buňky SCN neexprimují GR, GC cirkadiální rytmy v SCN neovlivňují. Tím je zachována nezávislost cirkadiálních rytmů SCN a jejich funkce

v regulování cirkadiálních rytmů periferních tkání (Balsalobre et al., 2000). Vliv GC na expresi genů tlumí komplex CLOCK/BMAL1, který acetyluje lysinové zbytky v pantové („hinge“) oblasti GR, a tím oslabuje jeho vazbu na GRE (Nader et al., 2009). Také CRY proteiny inhibují transkripci aktivovanou GR interakcí s C-koncem GR (Lamia et al., 2011). REV-ERBa způsobuje destabilizaci GR vazbou na HSP90, který GR stabilizuje. REV-ERBa také ovlivňuje lokalizaci GR v buňce (Okabe et al., 2016) (viz Obrázek 5).



Obrázek 5: Interakce mezi glukokortikoidním a cirkadiálním systémem. (a) Suprachiasmatická jádra (SCN) v hypothalamu jsou regulována světelnými signály z retiny. SCN reguluje funkci dráhy hypothalamus-hypofýza-nadledviny (HPA) a indukuje rytmickou produkci glukokortikoidů (GC) z nadledvin. Pomocí drah autonomního nervového systému (ANS) reguluje SCN citlivost buněk nadledvin na adrenokortikotropní hormon (ACTH). Periferní cirkadiální hodiny v játrech, tukové tkáni a ledvinách jsou regulovány GC a SCN. Během akutního stresu aktivují mozkový kmen a limbický systém HPA přes paraventriculární jádro (PVN), což vede k produkci GC. GC inhibují syntézu kortikotropního hormonu (CRH) a ACTH, čímž se hladina GC vrátí na základní hodnotu. (b) Interakce glukokortikoidního a cirkadiálního systému jsou založeny na dvou paralelních transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách, které se navzájem ovlivňují. Glukokortikoidní receptory (GR) s navázanými GC se vážou na glukokortikoid-zodpovědné části (GRE) v oblasti promotoru některých hodinových genů. Komplex CLOCK (CL) a BMAL1 (BM) acetyluje GR, čímž snižuje jeho afinitu na GRE. CRY1 a CRY2 interagují s C-koncem GR a inhibují transkripci řízenou GR. REV-ERBa interaguje s HSP90 (z angl. heat shock protein 90) a ovlivňuje stabilitu a lokalizaci GR. Některé geny obsahují v promotoru GRE i E-box oblasti a jsou regulovány oběma smyčkami. Tyto interakce mezi GR a cirkadiálními rytmy zajišťují fyziologickou reakci na informace z prostředí (upraveno podle Astiz & Oster, 2018).

2.3 Narušení cirkadiálních rytmů u schizofrenie

Pro schizofrenii jsou typické disturbance spánku a cirkadiálních rytmů. Ve studii kvality spánku a cirkadiálních rytmů se disturbance vyskytovaly u všech 20 pacientů se schizofrenií. Oproti kontrolám trvalo schizofrenikům déle usnout a měli delší a více nepravidelný spánek. Polovina pacientů měla desynchronizované cykly spánku/bdění (Wulff et al., 2012). Horší kvalita spánku u schizofreniků byla zjištěna i ve studii z roku 2016. V této

studii byla zkoumána i exprese mRNA hodinových genů ve fibroblastech odebraných z kůže pacientů se schizofrenií. Ztráta rytmické exprese byla pozorována u hodinových genů CRY1 a PER1 (Johansson et al., 2016).

Konkrétní mechanismy, jakým cirkadiánní a spánkové disturbance ovlivňují schizofrenii, zatím nejsou známe. Existuje však spojitost s náchylností k psychotickým stavům. Pacienti s vysokým klinickým rizikem pro psychózu vykazují větší spánkové disturbance než kontroly (Poe et al., 2017). Podle dopaminové hypotézy je náchylnost k psychóze spojená také s hyperdopaminergií ve striatu (Howes & Kapur, 2009) a u schizofreniků bylo ukázána zvýšená syntéza a uvolňování presynaptického dopaminu a abnormality dopaminových receptorů (Dahoun et al., 2017). Ve studii prováděné pomocí pozitronové emisní tomografie se u zdravých jedinců po spánkové deprivaci snížila vazba raklopridu ve striatu a talamu. Rakloprid kompetuje s dopaminem o vazbu na D2 a D3 receptory, což naznačuje, že po spánkové deprivaci došlo ke zvýšení hladiny dopaminu (Volkow et al., 2008). Na molekulární úrovni bylo ukázáno, že myši s mutací v genu *Clock* měly dvou až třináásobně zvýšenou expresi tyrosinhydroxylázy ve ventrální tegmentální oblasti. *Clock* by tedy mohl mít vliv na dopaminovou aktivitu (McClung et al., 2005). Dále byla u pacientů se schizofrenií, kteří prodělali první epizodu psychózy, zjištěna snížená exprese *Clock*, *Per2* a *Cry1* v krevních mononukleárních buňkách (Johansson et al., 2016). Spánkové a cirkadiánní disturbance by tedy mohly zvyšovat aktivitu dopaminu a náchylnost k psychózám (Yates, 2016).

Také abnormální funkce HPA je spojena s psychózami. U pacientů s první epizodou schizofrenie byly zjištěny vyšší hladiny kortizolu a adrenokortikotropního hormonu (Ryan et al., 2004). Abnormality HPA byly zkoumány u dětí ve věku 11-14 let se zvýšeným rizikem ke schizofrenii. Děti s rodinou historií schizofrenie měly sníženou GC odpověď po probuzení. Hladiny kortizolu se u rizikových dětí a kontrol nelišily. Autoři se domnívají, že snížená GC odpověď po probuzení by mohl být marker zvýšené náchylnosti k psychózám, zatímco zvýšená hladina kortizolu se vyskytuje až bezprostředně před nástupem onemocnění (Cullen et al., 2014).

2.4 Role DISC1 v regulaci spánku

Role DISC1 v cirkadiánních rytmech a spánku byla zkoumána na transgenních myších s vloženým genem pro lidský DISC1. Myši měly kratší spánek než kontroly a nižší delta aktivitu po dvouhodinové spánkové deprivaci. DISC1 by tedy mohl mít roli ve spánkové regulaci (Jaaro-Peled et al., 2016).

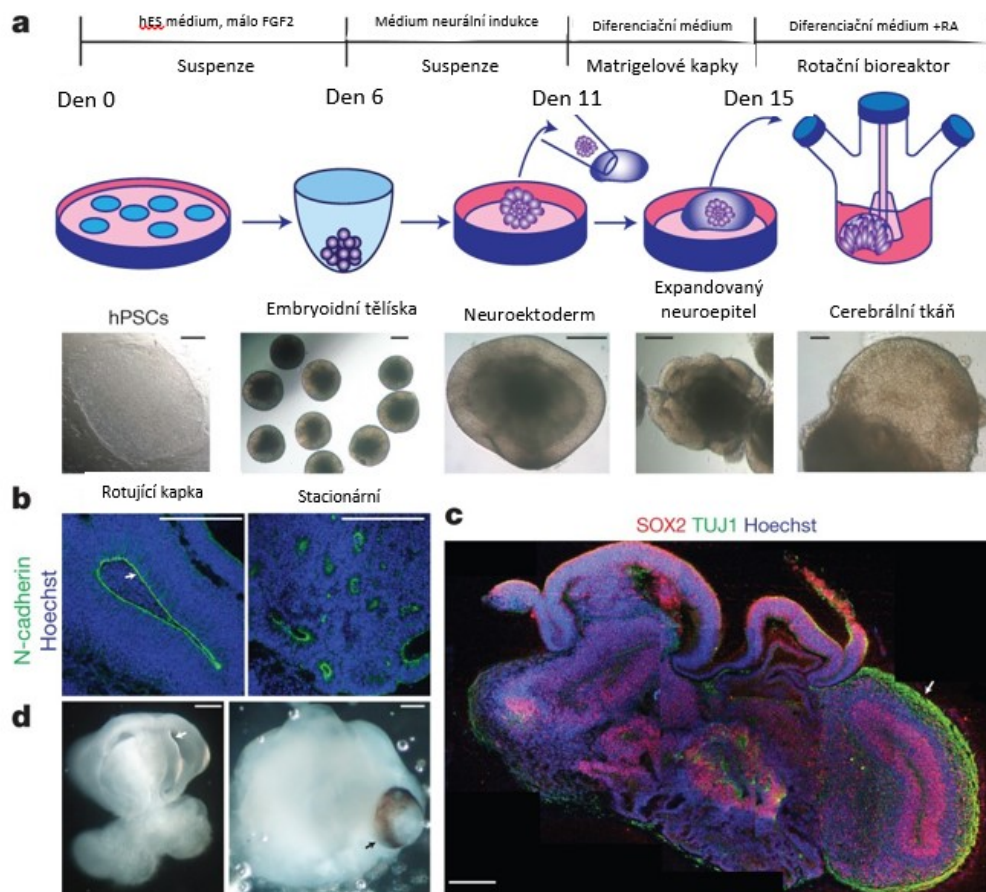
Bylo také ukázáno, že DISC1 ovlivňuje dopaminový systém. U transgenních potkanů s vloženým genem pro lidský DISC1 byly pozorovány abnormality přenosu dopaminu. Došlo k navýšení počtu vysokoafinních D2 receptorů a zvýšení translokace dopaminového transportéru do cytoplazmatické membrány (Trossbach et al., 2016). Dopamin ovlivňuje cykly spánku/bdění, jak ukázal výzkum prováděný na myších. U myši byla vyvolána zvýšená hladina extracelulárního dopaminu. Toho bylo dosaženo vyřazením genu pro dopaminový transportér, čímž bylo znemožněno zpětné vychytávání. Podobný efekt byl docílen i podáváním amfetaminu kontrolním myším. Po vystavení myši novému podnětu, vykazovaly tyto hyperdopaminergní myši abnormální stav podobný REM fázi spánku. Snížení hladiny dopaminu pomocí inhibitoru tyrosinhydroxylázy REM fázi spánku potlačilo a po podání agonisty D2 receptoru byl REM spánek obnoven (Dzirasa et al., 2006). DISC1 by tedy mohl ovlivňovat spánek pomocí dopaminového systému (Jaaro-Peled et al., 2016).

3. Cerebrální organoidy jako nový model neurovývojových onemocnění

Jelikož lidský mozek vykazuje určité odlišnosti od mozku modelových zvířat, je snaha vytvořit *in vitro* modely, které by věrně napodobovaly vývoj lidského mozku a mohly být využity ve výzkumu neurovývojových onemocnění (Lancaster & Knoblich, 2014). Lancaster et al. (2013) ve svém výzkumu vytvořili tzv. cerebrální organoidy, což je třírozměrná buněčná kultura vytvořená z lidských embryonálních kmenových buněk (ESCs, z angl. embryonic stem cells) nebo iPSCs, která napodobuje ranou fázi vyvíjejícího se lidského mozku. Autoři použili cerebrální organoidy ke studii mikrocefalie, kterou je jinak obtížné studovat na zvířecím modelu, a zjistili, že v těchto cerebrálních organoidech dochází k předčasné neurální diferenciaci v progenitorových zónách (Lancaster et al., 2013).

Lancaster et al. (2013) využili poznatku, že somatické buňky lze přeprogramovat na iPSCs po přidání čtyř transkripčních faktorů (Takahashi & Yamanaka, 2006), a vytvořili iPSCs z kožních fibroblastů odebraných od pacienta s mikrocefalií (Lancaster et al., 2013). Poté byly iPSCs přeneseny do média ESCs a za nízké koncentrace FGF2 ponechány agregovat do embryoidních tělísek (Lancaster & Knoblich, 2014), což jsou agregáty schopné diferenciovat do všech tří zárodečných listů (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Embryoidní tělíška byla následně přenesena do minimálního média, které umožňuje vznik pouze neuroektodermu (Lancaster & Knoblich, 2014). K neuroektodermální tkáni byl dále přidán Matrigel, hydrogel obsahující proteiny extracelulární matrix, který poskytuje strukturní oporu a podporuje správnou apikobasální orientaci embryoidních tělísek (Lancaster et al., 2013; Lancaster & Knoblich, 2014). Nakonec byla tkáň přenesena do rotačního bioreaktoru, který umožňuje lepší vstřebávání

živin (Lancaster et al., 2013). Tento protokol později vylepšili Qian et al. (2016), kteří zkonstruovali miniaturizovaný rotační bioreaktor, který snižuje náklady na tvorbu cerebrálních organoidů (Qian et al., 2016). Během 15 – 20 dní vytvořily cerebrální organoidy neuroepitel s dutinami naplněnými tekutinou, které připomínaly mozkové komory (Lancaster et al., 2013). Cerebrální organoidy jsou schopné sebeorganizace i bez přidaných růstových faktorů nebo morfogenů a dokonce v nich byla nalezena i organizační centra podobná těm v lidském mozku (Renner et al., 2017). Cerebrální organoidy vytvořily v průměru až 4mm heterogenní tkáň a v rotačním bioreaktoru mohly přežívat až několik měsíců. Cerebrální organoidy vytvořily jednotlivé mozkové části jako přední mozek, střední mozek, zadní mozek, hipokampus, *choroid plexus* a retinu, obsahovaly také neurální progenitory a napodobovaly vývoj lidského kortexu (Lancaster et al., 2013) (viz Obrázek 6).



Obrázek 6: Cerebrální organoidy. A) Schématické znázornění postupu tvorby cerebrálních organoidů. Lidské indukované pluripotentní buňky (hPSCs) agregují do embryoidních tělísek, ve kterých je následně indukována tvorba neuroektodermu. Neuroektodermální tkáň je přenesena do kapek Matrigelu, což umožní růst tkáň do složitější struktury. Poté je tkáň přenesena do rotačního bioreaktoru, který zlepšuje absorpci živin. B) Neuroepitelové tkáně vzniklé tímto postupem (vlevo) vykazují velké dutiny vyplněné tekutinou a typickou apikální lokalizaci neurálního N-kadherinu (šipka). Tyto tkáně byly větší a více kontinuální než tkáně ze statické suspenze bez Matrigelu (vpravo). C) Pomocí imunohistochemie byly nalezeny heterogenní oblasti v cerebrálním organoidu obsahující neurální progenitory (SOX2, červeně) a neurony (TUJ1, zeleně). D) Bright-field zobrazení v malém zvětšení znázorňující dutiny vyplněné tekutinou připomínající mozkové komory (bílá šipka) a tkáň retiny (černá šipka). Měřítka 200 μm . hES – lidské embryonální kmenové buňky. RA – kyselina retinová. SOX2 – SRY-box transkripční faktor 2. TUJ1 – β -tubulin třídy III. Hoechst – fluorescenční barvivo značící DNA (upraveno podle Lancaster et al., 2013).

3.1 Výzkumy na cerebrálních organoidech relevantní pro neurovývojový model schizofrenie

3.1.1 Vliv nFGFR1 na vývoj kortexu

Výzkumy vývoje kortexu na cerebrálních organoidech by mohly objasnit kortikální abnormality u schizofreniků, které byly zjištěny v různých studiích. Např. v *post mortem* analýze byla zjištěna abnormální lokalizace Cajal-Retziusových neuronů v první vrstvě prefrontálního kortexu (Kalus et al., 1997) a abnormální prostorová lokalizace neuronů v druhé a třetí vrstvě entorhinálního kortexu (Arnold et al., 1997). Magnetická rezonance dále ukázala redukci kortexu u schizofreniků (Gur et al., 1998; Harvey et al., 1993).

Stachowiak et al. (2017) vytvořili organoidy z iPSCs získaných ze tří pacientů se schizofrenií a čtyř zdravých jedinců. Pomocí imunobarvení byly označeny proliferující neurální progenitorové buňky, neuroblasty a nezralé neurony. Za dva týdny obsahovaly kontrolní organoidy dvě až tři vrstvy proliferujících neurálních progenitorových buněk ve ventrikulární zóně, několik neurálních progenitorů bylo v intermediální zóně a téměř žádné v kortikální zóně, což odpovídá normálnímu vývoji kortexu. Oproti tomu obsahovaly organoidy od iPSCs schizofreniků jen jednu vrstvu neurálních progenitorů, přičemž se neurální progenitory roztroušeně vyskytovaly i v intermediální a kortikální zóně. Organoidy od iPSCs schizofreniků také obsahovaly méně neuronů v kortikální zóně a maturované neurony se naopak nezvykle vyskytovaly v intermediální a ventrikulární zóně. Toto značí předčasný vývoj neuronů v subkortikální oblasti a poškozený vývoj kortexu. Kortikální oblast také vykazovala výrazně nižší expresi nFGFR1 než u kontrol, zatímco v subkortikálních zónách byla exprese nFGFR1 zachována (Stachowiak et al., 2017). V předchozí studii iPSCs získaných od pacientů se schizofrenií bylo zjištěno, že nFGFR1 je nadměrně exprimován v neurálních progenitorech (Narla et al., 2017). Vysoká exprese nFGFR1 by tedy mohla způsobovat předčasnou diferenciaci v subkortikálních zónách, zatímco ztráta nFGFR1 v kortikální zóně by mohla být jednou z příčin poruchy vývoje kortexu u schizofrenie. Obnovení nFGFR1 signalizace v kortexu by mohlo sloužit jako prevence schizofrenie (Stachowiak et al., 2017).

3.1.2 Studie DISC1

Korelace fenotypu pacientů a cerebrálních organoidů získaných z jejich iPSCs ukázala studie zkoumající pacienty s mikroduplikací 16p13.11 (Johnstone et al., 2019). Lokus na chromozómu 16p13 byl v genomové analýze asociován se schizofrenií u pacientů mající rizikovou alelu v genu *Disc1*. Tento lokus se nachází před genem pro protein NDE1 (z angl. nuclear distribution element 1) (Hennah et al., 2007), který je vazebným partnerem DISC1,

stejně tak jako jemu velmi podobný protein NDEL1 (z angl. NDE-like 1) (Brandon et al., 2004). NDEL1 s NDE1 se účastní regulace buněčného cyklu a v dělicích se buňkách se vyskytují u centrozómu, kinetochoru a jaderného obalu (Ye et al., 2017). U pacientů s mikroduplikací 16p13.11 byla zjištěna redukováná tloušťka kortexu pomocí magnetické rezonance. V souladu s tím dorůstaly cerebrální organoidy získané z iPSCs těchto pacientů do menší velikosti než cerebrální organoidy získané z kontrol. Navíc cerebrální organoidy pacientů vykazovaly redukovanou proliferaci neurálních progenitorů a abnormální dělení progenitorů radiálních glií. Redukovaná proliferace nastala i po vyvolání zvýšené exprese NDE1 u kontrolních neurálních progenitorů (Johnstone et al., 2019).

Bylo ukázáno, že DISC1 ovlivňuje lokalizaci NDEL1 na kinetochoru a interakce těchto dvou proteinů reguluje buněčný cyklus radiálních glií ve vyvíjejícím se kortexu u myši. Komplex byl dále studován na cerebrálních organoidech z iPSCs od pacienta se schizofrenií, který měl mutaci v genu *Disc1*, která znemožňuje vazbu DISC1 na NDEL1 a NDE1. Oproti kontrolám měly tyto cerebrální organoidy prodlouženou dobu mitózy v radiálních gliích. Tento výzkum tedy ukázal, jak mohou genetické rizikové faktory pro schizofrenii ovlivnit buněčné procesy během vývoje CNS (Ye et al., 2017).

3.1.3 Studium prenatálního stresu

V nové studii (zatím vyšla jen v předběžném tisku) byl studován vliv zvýšené hladiny GC (ve studii byl použit dexametazon) na vyvíjející se cerebrální organoidy. Po vystavení GC a aktivaci GR došlo k downregulaci genů pro maturaci neuronů. To značí, že aktivace GR by mohla vést k prodloužení procesů souvisejících s maturací a diferenciací neuronů (Cruceanu et al., 2020). Podobný efekt GC byl pozorován i na dvoudimenzionálním modelu lidských progenitorových buněk z hipokampu. V této studii bylo ukázáno, že vysoké koncentrace kortizolu a aktivace GR snižují proliferaci a diferenciací neuronů (Anacker et al., 2013).

Po aktivaci GR došlo v neuronech také ke zvýšení exprese genů, které byly v celogenomových studiích spojeny s neurovývojovými onemocněními. Tato studie tedy ukázala, že interakce genů a prenatálního stresu by mohla zvyšovat riziko neurovývojových onemocnění (Cruceanu et al., 2020).

3.2 Validita a limitace modelu

Cerebrální organoidy jsou schopny napodobit různé aspekty vývoje lidského CNS, jako je vývoj kortexu. Organoidy předního mozku obsahují progenitorové zóny, včetně vnitřní a vnější SVZ a také vrstvu vnějších radiálních glií, které vykazují molekulární a morfologické

podobnosti s vnějšími radiálními glii ve vyvíjejícím se lidském kortexu (Qian et al., 2016). Pomocí RNA sekvenace transkriptomů z jednotlivých buněk byl porovnán vývoj kortexu v cerebrálních organoidech a v lidském fetálním kortexu. Přes 80 % genů, které se účastní tvorby kortexu, bylo exprimováno podobným způsobem u lidského kortexu i u cerebrálních organoidů (Camp et al., 2015). Vývoj kortexu u organoidů však probíhá rychleji a progenitorové zóny neexpandují tolik jako u lidského kortexu (Bhaduri et al., 2020). Cerebrální organoidy také nedokáží vytvořit šestivrstevnou strukturu kortexu jako u lidského mozku (Lancaster & Knoblich, 2014).

Cerebrální organoidy obsahují různé buněčné typy včetně astrocytů, oligodendrocytů (Renner et al., 2017), GABAergních a dopaminergních neuronů a interneuronů a jsou schopné vytvořit různé mozkové struktury jako přední mozek, střední mozek, zadní mozek a retinu (Quadrato et al., 2017). Cerebrální organoidy tak umožňují studovat migraci neuronů a nervová spojení jednotlivých částí mozku (Kelava & Lancaster, 2016). Cerebrální organoidy však nezaujmají stejný tvar jako vyvíjející se mozek *in vivo*, což je zřejmě zapříčiněno absencí okolní tkáně a embryotických tělních os (Kelava & Lancaster, 2016; Yin et al., 2016). Dále vykazují jednotlivé vzorky cerebrálních organoidů morfologické odlišnosti a liší se i ve složení a pozici jednotlivých částí mozku. To vede k problémům s reprodukovatelností (Kelava & Lancaster, 2016). Tento problém by mohl být vyřešen pomocí bioinženýrských metod, jako např. vytvoření umělého lešení, které by napodobovalo buněčné interakce s extracelulární hmotou, nebo mikrofluidní částice, které by kontrolovaně vytvořily signální gradient (Yin et al., 2016). Kromě toho lze po přidání signálních molekul k embroidním tělískám vytvořit organoidy pouze jedné části mozku, čímž se sníží heterogenita jednotlivých organoidů (Qian et al., 2016).

V cerebrálních organoidech byly také detekovány spontánní vápníkové oscilace, které se zvýšily po přidání glutamátu. To dokazuje, že cerebrální organoidy vykazují neuronovou aktivitu (Lancaster et al., 2013). Navíc bylo zjištěno, že cerebrální organoidy reagují na stimulaci fotosenzitivních buněk, což znamená, že by cerebrální organoidy mohly být využity ke studii neuronální odpovědi na fyziologické podněty (Quadrato et al., 2017).

Kvůli chybějící vaskularizaci a nedostatečnému přísunu kyslíku a živin dorůstají cerebrální organoidy jen do omezené velikosti a uprostřed tkáně vznikají odumřelé buňky (Lancaster et al., 2013). Navíc bylo zjištěno, že faktory produkované endoteliálními buňkami jsou důležité pro neurogenezi (Shen et al., 2004). Vaskularizované cerebrální organoidy je však možné vytvořit pomocí přidání lidských ESCs se zvýšenou expresí transkripčního faktoru ETS (z angl. erythroblast transformation specific) varianty 2 (Cakir et al., 2019), který dokáže

přeprogramovat lidské ESCs na endoteliální buňky (Lee et al., 2017). Takto vaskularizované cerebrální organoidy vykazovaly rychlejší maturaci neuronů a i některé charakteristiky hematoencefalické bariéry, jako je výskyt těsných spojů mezi buňkami endotelu. Tyto cerebrální organoidy byly také schopné vytvořit vaskulární síť *in vivo*, což bylo dokázáno implantováním těchto organoidů do myši (Cakir et al., 2019).

V nedávné studii kortikálních organoidů bylo ukázáno, že ve všech částech organoidů jsou upregulované geny pro metabolický stres, který je vyvolaný *in vitro* prostředím organoidů. Důsledkem toho obsahují kortikální organoidy méně buněčných subtypů. Možným řešením je transplantace organoidů do myšičího kortexu, po které došlo k redukci metabolického stresu a zvýšení množství buněčných subtypů. Zároveň je tato studie ukázkou toho, že podobný efekt by mohl mít i prenatální metabolický stres *in vivo* (Bhaduri et al., 2020).

Závěr

V neurovývojovém modelu schizofrenie figurují genetické i environmentální faktory, jejichž souhra zatím není plně objasněna. Ukazuje se však, že prenatální stres by mohl zvyšovat riziko výskytu schizofrenie, a to zejména u mužů. Ve vývoji kortexu a dopaminergních neuronů má zřejmě důležitou roli FGFR1, který vykazuje odlišnou expresi u schizofreniků. Budoucí studie nFGFR1 signalizace v cerebrálních organoidech by mohly najít způsoby, jak se na tuto signální dráhu zaměřit a předejít kortikálním abnormalitám u schizofreniků. V cerebrálních organoidech by také mohl být více prozkoumán vliv GC na vývoj mozku a zjistit, zda spolu FGF a GC při vývoji interagují.

U pacientů se schizofrenií se hojně vyskytují spánkové a cirkadiánní abnormality, jejichž mechanismus vlivu na onemocnění zatím není dostatečně vysvětlen. Zdá se ale, že abnormality ve spánku, cirkadiánních rytmech a stresovém systému ovlivňují dopaminový systém, a tím zvyšují náchylnost k psychózám. Navíc by abnormality spánku mohly být podmíněny geneticky prostřednictvím *Disc1*. Ukazuje se také, že DISC1 ovlivňuje vývoj radiálních glií, který u schizofreniků vykazuje abnormality.

Ačkoli jsou cerebrální organoidy poměrně nový *in vitro* model, zdají se být jako vhodný prostředek ke studiu neurovývojových onemocnění, včetně schizofrenie. Zejména pokud bude model vylepšen pomocí vaskularizace, bioinženýrských metod a zlepšením reprodukovatelnosti. Velkou výhodou cerebrálních organoidů je, že se dají generovat z iPSCs pacientů. Mohly by tedy být využity pro výzkum neurovývojových abnormalit u pacientů s variantami genů rizikových pro schizofrenii. Cerebrální organoidy se tak nabízejí jako vhodný

model pro výzkum interakcí genetických a environmentálních rizikových faktorů a pro výzkum neurovývojového modelu schizofrenie.

Seznam použité literatury

* označena review

Anacker, C., Cattaneo, A., Luoni, A., Musaelyan, K., Zunszain, P. A., Milanese, E., Rybka, J., Berry, A., Cirulli, F., Thuret, S., Price, J., Riva, M. A., Gennarelli, M., & Pariante, C. M. (2013). Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, *38*(5), 872–883.

Arnold, S. E., Ruschinsky, D. D., & Han, L. Y. (1997). Further evidence of abnormal cytoarchitecture of the entorhinal cortex in schizophrenia using spatial point pattern analyses. *Biological Psychiatry*, *42*(8), 639–647.

* Astiz, M., & Oster, H. (2018). Perinatal programming of circadian clock-stress crosstalk. *Neural Plasticity*, *2018*(5689165), 1–12.

* Astolfi, A., Pantaleo, M. A., Indio, V., Urbini, M., & Nannini, M. (2020). The emerging role of the FGF/FGFR pathway in gastrointestinal stromal tumor. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9), 3313.

Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G., & Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, *289*(5488), 2344–2347.

Barbazanges, A., Piazza, P. V., Le Moal, M., & Maccari, S. (1996). Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *Journal of Neuroscience*, *16*(12), 3943–3949.

Bhaduri, A., Andrews, M. G., Mancina Leon, W., Jung, D., Shin, D., Allen, D., Jung, D., Schmunk, G., Haeussler, M., Salma, J., Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., & Kriegstein, A. R. (2020). Cell stress in cortical organoids impairs molecular subtype specification. *Nature*, *578*(7793), 142–148.

Bouvier, M. M., & Mytilineou, C. (1995). Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *Journal of Neuroscience*, *15*(11), 7141–7149.

Brandon, N. J., Handford, E. J., Schurov, I., Rain, J. C., Pelling, M., Duran-Jimeniz, B.,

- Camargo, L. M., Oliver, K. R., Beher, D., Shearman, M. S., & Whiting, P. J. (2004). Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: Implications for schizophrenia and other major neurological disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *25*(1), 42–55.
- * Bronson, S. L., & Bale, T. L. (2016). The placenta as a mediator of stress effects on neurodevelopmental reprogramming. *Neuropsychopharmacology*, *41*(1), 207–218.
- Cakir, B., Xiang, Y., Tanaka, Y., Kural, M. H., Parent, M., Kang, Y. J., Chapeton, K., Patterson, B., Yuan, Y., He, C. S., Raredon, M. S. B., Dengelegi, J., Kim, K. Y., Sun, P., Zhong, M., Lee, S., Patra, P., Hyder, F., Niklason, L. E., Lee, S. H., Yoon, Y. S., & Park, I. H. (2019). Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nature Methods*, *16*(11), 1169–1175.
- Callicott, J. H., Straub, R. E., Pezawas, L., Egan, M. F., Mattay, V. S., Hariri, A. R., Verchinski, B. A., Meyer-Lindenberg, A., Balkissoon, R., Kolachana, B., Goldberg, T. E., & Weinberger, D. R. (2005). Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(24), 8627–8632.
- Camp, J. G., Badsha, F., Florio, M., Kanton, S., Gerber, T., Wilsch-Bräuninger, M., Lewitus, E., Sykes, A., Hevers, W., Lancaster, M., Knoblich, J. A., Lachmann, R., Pääbo, S., Huttner, W. B., & Treutlein, B. (2015). Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(51), 15672–15677.
- * Catts, V. S., Fung, S. J., Long, L. E., Joshi, D., Vercammen, A., Allen, K. M., Fillman, S. G., Rothmond, D. A., Sinclair, D., Tiwari, Y., Tsai, S. Y., Weickert, T. W., & Weickert, C. S. (2013). Rethinking schizophrenia in the context of normal neurodevelopment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 60.
- Chesney, E., Goodwin, G. M., & Fazel, S. (2014). Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: A meta-review. *World Psychiatry*, *13*(2), 153–160.
- * Cox, K. H., & Takahashi, J. S. (2019). Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *Journal of Molecular Endocrinology*, *63*(4), 93–102.
- Cruceanu, C., Dony, L., Krontira, A. C., Fischer, D. S., Roeh, S., Di Giaimo, R., Kyrousi, C.,

- Arloth, J., Czamara, D., Martinelli, S., Wehner, S., Breen, M. S., Koedel, M., Sauer, S., Rex-Haffner, M., Cappello, S., Theis, F. J., & Binder, E. B. (2020). Cell-type specific impact of glucocorticoid receptor activation on the developing brain. *BioRxiv*.
- Cullen, A. E., Zunszain, P. A., Dickson, H., Roberts, R. E., Fisher, H. L., Pariante, C. M., & Laurens, K. R. (2014). Cortisol awakening response and diurnal cortisol among children at elevated risk for schizophrenia: Relationship to psychosocial stress and cognition. *Psychoneuroendocrinology*, *46*, 1–13.
- * Dahoun, T., Trossbach, S. V., Brandon, N. J., Korth, C., & Howes, O. D. (2017). The impact of disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) on the dopaminergic system: A systematic review. *Translational Psychiatry*, *7*(1), 1015.
- * Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2009). The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology*, *72*, 517–549.
- Dunham-Ems, S. M., Lee, Y.-W., Stachowiak, E. K., Pudavar, H., Claus, P., Prasad, P. N., & Stachowiak, M. K. (2009). Fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) nuclear dynamics reveal a novel mechanism in transcription control. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(9), 2401–2412.
- Dunham-Ems, S. M., Pudavar, H. E., Myers, J. M., Maher, P. A., Prasad, P. N., & Stachowiak, M. K. (2006). Factors controlling fibroblast growth factor receptor-1's cytoplasmic trafficking and its regulation as revealed by FRAP analysis. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(5), 2223–2235.
- Dzirasa, K., Ribeiro, S., Costa, R., Santos, L. M., Lin, S. C., Grosmark, A., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., & Nicolelis, M. A. L. (2006). Dopaminergic control of sleep-wake states. *Journal of Neuroscience*, *26*(41), 10577–10589.
- Ellman, L. M., Murphy, S. K., Maxwell, S. D., Calvo, E. M., Cooper, T., Schaefer, C. A., Bresnahan, M. A., Susser, E. S., & Brown, A. S. (2019). Maternal cortisol during pregnancy and offspring schizophrenia: Influence of fetal sex and timing of exposure. *Schizophrenia Research*, *213*, 15–22.
- Fang, X., Stachowiak, E. K., Dunham-Ems, S. M., Klejbor, I., & Stachowiak, M. K. (2005). Control of CREB-binding protein signaling by nuclear fibroblast growth factor receptor-1: A novel mechanism of gene regulation. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(31),

28451–28462.

- * Ferguson, A. V., Latchford, K. J., & Samson, W. K. (2008). The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets, 12*(6), 717–727.
- Fineberg, A. M., Ellman, L. M., Schaefer, C. A., Maxwell, S. D., Shen, L., Chaudhury, N. H., Cook, A. L., Bresnahan, M. A., Susser, E. S., & Brown, A. S. (2016). Fetal exposure to maternal stress and risk for schizophrenia spectrum disorders among offspring: Differential influences of fetal sex. *Psychiatry Research, 236*, 91–97.
- Gaughran, F., Payne, J., Sedgwick, P. M., Cotter, D., & Berry, M. (2006). Hippocampal FGF-2 and FGFR1 mRNA expression in major depression, schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Research Bulletin, 70*(3), 221–227.
- Gitau, R., Adams, D., Fisk, N. M., & Glover, V. (2005). Fetal plasma testosterone correlates positively with cortisol. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition, 90*(2), 166–169.
- * Gottesman, I. I., & Erlenmeyer-Kimling, L. (2001). Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. *Schizophrenia Research, 51*(1), 93–102.
- Gur, R. E., Cowell, P., Turetsky, B. I., Gallacher, F., Cannon, T., Bilker, W., & Gur, R. C. (1998). A follow-up magnetic resonance imaging study of schizophrenia: Relationship of neuroanatomical changes to clinical and neurobehavioral measures. *Archives of General Psychiatry, 55*(2), 145–152.
- * Harvey, I., Ron, M. A., Boulay, G. D., Wicks, D., & Lewis, S. W. (1993). Reduction of cortical volume in schizophrenia on magnetic resonance imaging. *Psychological Medicine, 23*(3), 591–604.
- Hashimoto, K., Shimizu, E., Komatsu, N., Nakazato, M., Okamura, N., Watanabe, H., Kumakiri, C., Shinoda, N., Okada, S. I., Takei, N., & Iyo, M. (2003). Increased levels of serum basic fibroblast growth factor in schizophrenia. *Psychiatry Research, 120*(3), 211–218.
- Hennah, W., Tomppo, L., Hiekkalinna, T., Palo, O. M., Kilpinen, H., Ekelund, J., Tuulio-Henriksson, A., Silander, K., Partonen, T., Paunio, T., Terwilliger, J. D., Lönnqvist, J., &

- Peltonen, L. (2007). Families with the risk allele of DISC1 reveal a link between schizophrenia and another component of the same molecular pathway, NDE1. *Human Molecular Genetics*, 16(5), 453–462.
- Hövel, F. F., Leiter, I., Rumpel, R., Langenhagen, A., Wedekind, D., Häger, C., Bleich, A., Palme, R., & Grothe, C. (2019). FGF-2 isoforms influence the development of dopaminergic neurons in the murine substantia nigra, but not anxiety-like behavior, stress susceptibility, or locomotor behavior. *Behavioural Brain Research*, 374, 112113.
- * Howes, O. D., & Kapur, S. (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III - the final common pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 549–562.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., & Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine*, 6(2), 88–95.
- Jaaro-Peled, H., Altimus, C., LeGates, T., Cash-Padgett, T., Zoubovsky, S., Hikida, T., Ishizuka, K., Hattar, S., Mongrain, V., & Sawa, A. (2016). Abnormal wake/sleep pattern in a novel gain-of-function model of DISC1. *Neuroscience Research*, 112, 63–69.
- Johansson, A. S., Owe-Larsson, B., Hetta, J., & Lundkvist, G. B. (2016). Altered circadian clock gene expression in patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 174(1–3), 17–23.
- Johnstone, M., Vasistha, N. A., Barbu, M. C., Dando, O., Burr, K., Christopher, E., Glen, S., Robert, C., Fetit, R., Macleod, K. G., Livesey, M. R., Clair, D. S., Blackwood, D. H. R., Millar, K., Carragher, N. O., Hardingham, G. E., Wyllie, D. J. A., Johnstone, E. C., Whalley, H. C., McIntosh, A. M., Lawrie, S. M., & Chandran, S. (2019). Reversal of proliferation deficits caused by chromosome 16p13.11 microduplication through targeting NFκB signaling: An integrated study of patient-derived neuronal precursor cells, cerebral organoids and in vivo brain imaging. *Molecular Psychiatry*, 24(2), 294–311.
- Kalus, P., Senitz, D., & Beckmann, H. (1997). Cortical layer I changes in schizophrenia: A marker for impaired brain development? *Journal of Neural Transmission*, 104(4–5), 549–559.
- * Kapoor, A., Dunn, E., Kostaki, A., Andrews, M. H., & Matthews, S. G. (2006). Fetal

programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: Prenatal stress and glucocorticoids. *The Journal of Physiology*, 572(1), 31–44.

* Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016). Stem cell models of human brain development. *Cell Stem Cell*, 18(6), 736–748.

Kendler, K. S., & Gardner, C. O. (1997). The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: A comparison of three independent studies. *Psychological Medicine*, 27(2), 411–419.

Klejbor, I., Myers, J. M., Hausknecht, K., Corso, T. D., Gambino, A. S., Morys, J., Maher, P. A., Hard, R., Richards, J., Stachowiak, E. K., & Stachowiak, M. K. (2006). Fibroblast growth factor receptor signaling affects development and function of dopamine neurons - inhibition results in a schizophrenia-like syndrome in transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*, 97(5), 1243–1258.

Koenig, J. I., Elmer, G. I., Shepard, P. D., Lee, P. R., Mayo, C., Joy, B., Hercher, E., & Brady, D. L. (2005). Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: Potential relevance to schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 156(2), 251–261.

Koike, N., Yoo, S. H., Huang, H. C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T. K., & Takahashi, J. S. (2012). Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, 338(6105), 349–354.

Lamia, K. A., Papp, S. J., Yu, R. T., Barish, G. D., Uhlentaut, N. H., Jonker, J. W., Downes, M., & Evans, R. M. (2011). Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature*, 480(7378), 552–556.

Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 9(10), 2329–2340.

Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467), 373–379.

Lee, S., Park, C., Han, J. W., Kim, J. Y., Cho, K., Kim, E. J., Kim, S., Lee, S. J., Oh, S. Y., Tanaka, Y., Park, I. H., An, H. J., Shin, C. M., Sharma, S., & Yoon, Y. S. (2017). Direct

- reprogramming of human dermal fibroblasts into endothelial cells using ER71/ETV2. *Circulation Research*, 120(5), 848–861.
- * Lewis, D. A., & Levitt, P. (2002). Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 409–432.
- * Lipner, E., Murphy, S. K., & Ellman, L. M. (2019). Prenatal maternal stress and the cascade of risk to schizophrenia spectrum disorders in offspring. *Current Psychiatry Reports*, 21(10), 99.
- McClung, C. A., Sidiropoulou, K., Vitaterna, M., Takahashi, J. S., White, F. J., Cooper, D. C., & Nestler, E. J. (2005). Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9377–9381.
- * McGowan, P. O., & Matthews, S. G. (2018). Prenatal stress, glucocorticoids, and developmental programming of the stress response. *Endocrinology*, 159(1), 69–82.
- * McGrath, J., Saha, S., Chant, D., & Welham, J. (2008). Schizophrenia: A concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiologic Reviews*, 30(1), 67–76.
- * Molteni, R., Fumagalli, F., Magnaghi, V., Roceri, M., Gennarelli, M., Racagni, G., Melcangi, R. C., & Riva, M. A. (2001). Modulation of fibroblast growth factor-2 by stress and corticosteroids: From developmental events to adult brain plasticity. *Brain Research Reviews*, 37(1–3), 249–258.
- * Muraki, K., & Tanigaki, K. (2015). Neuronal migration abnormalities and its possible implications for schizophrenia. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 74.
- Nader, N., Chrousos, G. P., & Kino, T. (2009). Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: Potential physiological implications. *The FASEB Journal*, 23(5), 1572–1583.
- * Nader, N., Chrousos, G. P., & Kino, T. (2010). Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(5), 277–286.
- Narla, S. T., Lee, Y. W., Benson, C. A., Sarder, P., Brennand, K. J., Stachowiak, E. K., & Stachowiak, M. K. (2017). Common developmental genome deprogramming in schizophrenia — role of integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS). *Schizophrenia*

Research, 185, 17–32.

- Okabe, T., Chavan, R., Costa, S. S. F., Brenna, A., Ripperger, J. A., & Albrecht, U. (2016). REV-ERB α influences the stability and nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Journal of Cell Science*, 129(21), 4143–4154.
- * Owen, M. J., Sawa, A., & Mortensen, P. B. (2016). Schizophrenia. *The Lancet*, 388(10039), 86–97.
- Poe, S. L., Brucato, G., Bruno, N., Arndt, L. Y., Ben-David, S., Gill, K. E., Colibazzi, T., Kantrowitz, J. T., Corcoran, C. M., & Girgis, R. R. (2017). Sleep disturbances in individuals at clinical high risk for psychosis. *Psychiatry Research*, 249, 240–243.
- Qian, X., Nguyen, H. N., Song, M. M., Hadiono, C., Ogden, S. C., Hammack, C., Yao, B., Hamersky, G. R., Jacob, F., Zhong, C., Yoon, K. J., Jeang, W., Lin, L., Li, Y., Thakor, J., Berg, D. A., Zhang, C., Kang, E., Chickering, M., Nauen, D., Ho, C. Y., Wen, Z., Christian, K. M., Shi, P. Y., Maher, B. J., Wu, H., Jin, P., Tang, H., Song, H., & Ming, G. L. (2016). Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell*, 165(5), 1238–1254.
- Quadrato, G., Nguyen, T., Macosko, E. Z., Sherwood, J. L., Yang, S. M., Berger, D. R., Maria, N., Scholvin, J., Goldman, M., Kinney, J. P., Boyden, E. S., Lichtman, J. W., Williams, Z. M., McCarroll, S. A., & Arlotta, P. (2017). Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*, 545(7652), 48–53.
- * Rapoport, J. L., Giedd, J. N., & Gogtay, N. (2012). Neurodevelopmental model of schizophrenia: Update 2012. *Molecular Psychiatry*, 17(12), 1228–1238.
- Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A., & Lesch, K. P. (2006). Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Molecular Psychiatry*, 11(5), 514–522.
- Renner, M., Lancaster, M. A., Bian, S., Choi, H., Ku, T., Peer, A., Chung, K., & Knoblich, J. A. (2017). Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. *The EMBO Journal*, 36(10), 1316–1329.
- * Reuss, B., & von Bohlen und Halbach, O. (2003). Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell and Tissue Research*, 313(2), 139–157.
- Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T. R., Farh, K. H., Holmans, P. A., Lee, P.,

- Bulik-Sullivan, B., Collier, D. A., Huang, H., Pers, T. H., Agartz, I., Agerbo, E., Albus, M., Alexander, M., Amin, F., Bacanu, S. A., Begemann, M., Belliveau, R. A., ... O'Donovan, M. C. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, *511*(7510), 421–427.
- Ryan, M. C. M., Sharifi, N., Condren, R., & Thakore, J. H. (2004). Evidence of basal pituitary-adrenal overactivity in first episode, drug naïve patients with schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, *29*(8), 1065–1070.
- * Sarlus, H., Fontana, J. M., Tserga, E., Meltser, I., Cederroth, C. R., & Canlon, B. (2019). Circadian integration of inflammation and glucocorticoid actions: Implications for the cochlea. *Hearing Research*, *377*, 53–60.
- Schmid, R. S., McGrath, B., Berechid, B. E., Boyles, B., Marchionni, M., Šestan, N., & Anton, E. S. (2003). Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 4251–4256.
- * Schmidt, M. J., & Mirnics, K. (2015). Neurodevelopment, GABA system dysfunction, and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *40*(1), 190–206.
- Shen, Q., Goderie, S. K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., & Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*, *304*(5675), 1338–1340.
- Shi, Y., Li, Z., Xu, Q., Wang, T., Li, T., Shen, J., Zhang, F., Chen, J., Zhou, G., Ji, W., Li, B., Xu, Y., Liu, D., Wang, P., Yang, P., Liu, B., Sun, W., Wan, C., Qin, S., He, G., Steinberg, S., Cichon, S., Werge, T., Sigurdsson, E., Tosato, S., Palotie, A., Nöthen, M. M., Rietschel, M., Ophoff, R. A., Collier, D.A., Rujescu, D., Clair, D.S., Stefansson, H., Stefansson, K., Ji, J., Wang, Q., Li, W., Zheng, L., Zhang, H., Feng, G., & He, L. (2011). Common variants on 8p12 and 1q24.2 confer risk of schizophrenia. *Nature Genetics*, *43*(12), 1224–1227.
- Stachowiak, E. K., Benson, C. A., Narla, S. T., Dimitri, A., Chuye, L. E. B., Dhiman, S., Harikrishnan, K., Elahi, S., Freedman, D., Brennand, K. J., Sarder, P., & Stachowiak, M. K. (2017). Cerebral organoids reveal early cortical maldevelopment in schizophrenia—computational anatomy and genomics, role of FGFR1. *Translational Psychiatry*, *7*(11), 6.

- * Stachowiak, M. K., Kucinski, A., Curl, R., Syposs, C., Yang, Y., Narla, S., Terranova, C., Prokop, D., Klejbor, I., Bencherif, M., Birkaya, B., Corso, T., Parikh, A., Tzanakakis, E. S., Wersinger, S., & Stachowiak, E. K. (2013). Schizophrenia: A neurodevelopmental disorder - integrative genomic hypothesis and therapeutic implications from a transgenic mouse model. *Schizophrenia Research*, *143*(2–3), 367–376.
- Stachowiak, E. K., Roy, I., Lee, Y. W., Capacchietti, M., Aletta, J. M., Prasad, P. N., & Stachowiak, M. K. (2009). Targeting novel integrative nuclear FGFR1 signaling by nanoparticle-mediated gene transfer stimulates neurogenesis in the adult brain. *Integrative Biology*, *1*(5–6), 394–403.
- * Stachowiak, M. K., & Stachowiak, E. K. (2016). Evidence-based theory for integrated genome regulation of ontogeny—an unprecedented role of nuclear FGFR1 signaling. *Journal of Cellular Physiology*, *231*(6), 1199–1218.
- Stark, M. J., Wright, I. M. R., & Clifton, V. L. (2009). Sex-specific alterations in placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 activity and early postnatal clinical course following antenatal betamethasone. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *297*(2), 510–514.
- Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T. T., Hjaltason, O., Birgisdottir, B., Jonsson, H., Gudnadottir, V. G., Gudmundsdottir, E., Bjornsson, A., Ingvarsson, B., Ingason, A., Sigfusson, S., Hardardottir, H., Harvey, R. P., Lai, D., Zhou, M., Brunner, D., Mutel, V., Gonzalo, A., Lemke, G., Sainz, J., Johannesson, G., Andresson, T., Gudbjartsson, D., Manolescu, A., Frigge, M. L., Gurney, M. E., Kong, A., Gulcher, J. R., Petursson, H., & Stefansson, K. (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, *71*(4), 877–892.
- * Swerdlow, N. R., Braff, D. L., Taaid, N., & Geyer, M. A. (1994). Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Archives of General Psychiatry*, *51*(2), 139–154.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663–676.
- * Talaei, A., Farkhondeh, T., & Forouzanfar, F. (2020). Fibroblast growth factor: Promising target for schizophrenia. *Current Drug Targets*, *21*(13), 1344–1353.

- Tomlinson, J. W., & Stewart, P. M. (2001). Cortisol metabolism and the role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 15(1), 61–78.
- Trossbach, S. V., Bader, V., Hecher, L., Pum, M. E., Masoud, S. T., Prikulis, I., Schäble, S., De Souza Silva, M. A., Su, P., Boulat, B., Chwiesko, C., Poschmann, G., Stühler, K., Lohr, K. M., Stout, K. A., Oskamp, A., Godsave, S. F., Müller-Schiffmann, A., Bilzer, T., Steiner, H., Peters, P. J., Bauer, A., Sauvage, M., Ramsey, A. J., Miller, G. W., Liu, F., Seeman, P., Brandon, N. J., Huston, J. P., & Korth, C. (2016). Misassembly of full-length disrupted-in-schizophrenia 1 protein is linked to altered dopamine homeostasis and behavioral deficits. *Molecular Psychiatry*, 21(11), 1561–1572.
- * Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53(4), 865–871.
- Ueno, H., Gunn, M., Dell, K., Tseng, A., & Williams, L. (1992). A truncated form of fibroblast growth factor receptor 1 inhibits signal transduction by multiple types of fibroblast growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 1470–1476.
- Ursini, G., Punzi, G., Chen, Q., Marengo, S., Robinson, J. F., Porcelli, A., Hamilton, E. G., Mitjans, M., Maddalena, G., Begemann, M., Seidel, J., Yanamori, H., Jaffe, A. E., Berman, K. F., Egan, M. F., Straub, R. E., Colantuoni, C., Blasi, G., Hashimoto, R., Rujescu, D., Ehrenreich, H., Bertolino, A., & Weinberger, D. R. (2018). Convergence of placenta biology and genetic risk for schizophrenia article. *Nature Medicine*, 24(6), 792–801.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Telang, F., Fowler, J. S., Logan, J., Wong, C., Ma, J., Pradhan, K., Tomasi, D., Thanos, P. K., Ferré, S., & Jayne, M. (2008). Sleep deprivation decreases binding of [¹¹C]raclopride to dopamine D2/D3 receptors in the human brain. *Journal of Neuroscience*, 28(34), 8454–8461.
- * Walker, E., Mittal, V., & Tessner, K. (2008). Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annual Review of Clinical Psychology*, 4, 189–216.
- * Weissleder, C., North, H. F., & Shannon Weickert, C. (2019). Important unanswered questions about adult neurogenesis in schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry*, 32(3), 170–178.

- Wilson, H. A., Martin, E. R., Howes, C., Wasson, C. S., Newman, A. E. M., Choleris, E., & MacLusky, N. J. (2020). Low dose prenatal testosterone exposure decreases the corticosterone response to stress in adult male, but not female, mice. *Brain Research, 1729*, 146613.
- Wulff, K., Dijk, D. J., Middleton, B., Foster, R. G., & Joyce, E. M. (2012). Sleep and circadian rhythm disruption in schizophrenia. *British Journal of Psychiatry, 200*(4), 308–316.
- * Yates, N. J. (2016). Schizophrenia: The role of sleep and circadian rhythms in regulating dopamine and psychosis. *Reviews in the Neurosciences, 27*(7), 669–687.
- Ye, F., Kang, E., Yu, C., Qian, X., Jacob, F., Yu, C., Mao, M., Poon, R. Y. C., Kim, J., Song, H., Ming, G. li, & Zhang, M. (2017). DISC1 regulates neurogenesis via modulating kinetochore attachment of Ndel1/Nde1 during mitosis. *Neuron, 96*(5), 1041-1054.e5.
- * Yin, X., Mead, B. E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J. M., & Levy, O. (2016). Engineering stem cell organoids. *Cell Stem Cell, 18*(1), 25–38.