

Synaptische Plastizität im Kleinhirnkortex von FoxP2-mutanten Mäusen

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

Dr. med.

**an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig**

eingereicht von

Muriel Georgette Stoppe, geb. Baum; geboren am 11.10.1983 in Münster

angefertigt am

Institut für Physiologie, Abt. Neurophysiologie, der Medizinischen Fakultät der
Universität Leipzig

Betreuer

Prof. Dr. med. Jens Eilers

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 13.12.2011

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Darstellung.....	3
Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung	6
1.1 KE-Familie.....	6
1.2 FoxP2-Gen.....	7
1.2.1 Expressionsorte von FoxP2.....	10
1.2.2 Hypothese zur Funktion des FoxP2-Gens	12
1.3 Modellsystem Maus.....	12
1.3.1 Mausmodell mit ausgeschaltetem FoxP2-Gen	13
1.3.2 Mausmodell mit KE-Familien-Punktmutation im FoxP2-Gen.....	14
2 Zielsetzung.....	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Kleinhirnkortex.....	19
3.2 Akute cerebelläre Hirnschnittpräparate.....	20
3.3 Elektrophysiologie.....	22
3.3.1 Patch-Clamp-Technik an der Purkinjezelle	22
3.3.2 Stimulation der erregenden Eingänge der Purkinjezelle	24
3.4 Datenerfassung.....	24
3.5 Statistik	25
4 Ergebnisse	26
4.1 Charakterisierung erregender Eingänge der Purkinjezelle.....	26
4.1.1 Charakterisierung der Kletterfaser-Purkinjezell-Synapsen	26
4.1.2 Charakterisierung der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapsen	30
4.2 Synaptische Plastizität an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse	32
4.2.1 Langzeitdepression an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse	32
4.2.2 Paarpulsbahnung an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse.....	38
5 Diskussion.....	42
5.1 KE-Familie.....	42
5.2 Beteiligte Schaltkreise bei Veränderungen der KE-Familie.....	45
5.3 Beteiligte Schaltkreise beim Spracherwerb	47
5.4 Ausblick	49
5.4.1 Weitere Charakterisierung der KE-Mutation.....	49
5.4.2 Konditionales Mausmodell.....	50
6 Zusammenfassung.....	52
7 Literaturverzeichnis	58
8 Anhang.....	63
8.1 Groszer et al. 2008	63
8.2 Groszer et al. 2008, Ergänzende Daten.....	72
9 Selbstständigkeitserklärung.....	79
10 Lebenslauf	80
11 Danksagung	83

Bibliographische Darstellung

Muriel Georgette Stoppe

Synaptische Plastizität im Kleinhirnkortex von FoxP2-mutanten Mäusen*

Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Dissertation
83 Seiten, 60 Literaturangaben, 26 Abbildungen, 2 Anlagen

Die KE-Familie ist das am ausführlichsten untersuchte Beispiel für eine angeborene spezifische Sprachstörung. Die Sprachstörung in dieser Familie wird durch eine heterozygote Punktmutation im FoxP2-Gen hervorgerufen, die R553H-Mutation. Die betroffenen Mitglieder der Großfamilie haben Defizite beim Erlernen komplexer orofazialer Bewegungsabläufe als Grundlage des fließenden Sprechens und zeigen Störungen beim Sprachverständnis und beim Schreiben.

Untersuchungen an der KE-Familie und an Knockout-Tieren hatten Hinweise auf eine Beteiligung des Kleinhirns an der Sprachstörung der KE-Familie geliefert. Entsprechend war zu erwarten, dass genauere Kenntnisse über den Einfluss vom FoxP2-Gen auf Entwicklung und Funktion des Kleinhirns helfen könnten, die Funktion von FoxP2 und seine Rolle bezüglich dieser Sprachstörung, aber auch in Hinblick auf die Sprachfähigkeit des Menschen weiter aufzuschlüsseln.

Die Experimente, die der vorliegenden Promotionsarbeit zu Grunde liegen, erforschten erstmals den Einfluss der KE-Mutation im FoxP2-Gen auf synaptischer Ebene durch Untersuchungen am in der Literatur ausführlich beschriebenen erregenden Schaltkreis im Kleinhirnkortex von heterozygoten R552H-Mäusen. Elektrophysiologische Messungen dienten dazu, die Verschaltung der Parallelfasern und Kletterfasern auf die Purkinjezelle auf Veränderungen der Übertragungseigenschaften zu prüfen. Durch Induktion von Langzeitdepression und Paarpulsbahnung an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse sollte die synaptische Plastizität untersucht werden. Es zeigten sich eine intakte Verschaltung der erregenden Eingänge auf die Purkinjezelle, jedoch Veränderungen der Langzeit- und der Kurzzeitplastizität: Nach Induktion von Langzeitdepression entwickelte sich diese signifikant schneller. Die Paarpulsbahnung war bei kurzen Interstimulusintervallen signifikant verstärkt. Die Befunde sprechen für einen Einfluss des FoxP2-Gens auf die synaptischen Eigenschaften im Kleinhirnkortex. Die Aufschlüsselung dieses Einflusses und seine Bedeutung für die Sprachstörung der KE-Familie und die Sprachentwicklung beim Menschen ist Gegenstand weiterer Forschung.

* Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden vorab veröffentlicht in Groszer M, Keays DA, Deacon RM, de Bono JP, Prasad-Mulcare S, Gaub S, **Baum MG**, French CA, Nicod J, Coventry JA, Enard W, Fray M, Brown SD, Nolan PM, Pääbo S, Channon KM, Costa RM, Eilers J, Ebret G, Rawlins JN, Fisher SE, Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits, Curr. Biol. 2008 Mar 11;18:354-62.

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	engl.: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	engl.: analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
df	engl.: degrees of freedom
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EPSC	engl.: excitatory postsynaptic current
EPSP	engl.: excitatory postsynaptic potential
FoxP2	Forkhead-Box P2
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPSC	engl.: inhibitory postsynaptic current
ISI	Interstimulusintervall
KO	Knockout
LTD	engl.: long-term depression
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Stammbaum der KE-Familie	7
Abbildung 1.2: FoxP2-Gen	8
Abbildung 1.3: Mutation der KE-Familie	9
Abbildung 1.4: Aminosäure-Sequenz des FoxP2-Gens	10
Abbildung 1.5: Expressionsorte des FoxP2-Proteins	11
Abbildung 1.6: Gendefekt der FoxP2-Knockout-Maus	13
Abbildung 1.7: Purkinjenzell-Anordnung der FoxP2-Knock-out-Mäuse	14
Abbildung 1.8: FoxP2-Gen der R552H-Maus	15
Abbildung 1.9: Kleinhirn-Morphologie der R552H-Mäuse	16
Abbildung 3.1: Aufbau des Kleinhirnkortex	20
Abbildung 3.2: Schritte der Präparation akuter Hirnschnitte	21
Abbildung 3.3: Generierung der <i>whole-cell</i> Konfiguration	23
Abbildung 4.1: Stimulation der Kletterfaser	27
Abbildung 4.2: Kletterfaser-induzierte komplexe Aktionspotentiale (<i>complex spikes</i>)	28
Abbildung 4.3: Wirkung von CNQX in submaximaler Dosierung auf die Kletterfaser-induzierte Purkinjenzell-Antwort in der Spannungsklemme	29
Abbildung 4.4: „Alles-oder-Nichts“-Verhalten des Kletterfasereingangs bei heterozygoten R552H-Mäusen	30
Abbildung 4.5: Parallelfaser-induzierte Purkinjenzell-EPSPs bei steigender Stimulationsstärke	31
Abbildung 4.6: Parallelfaser-induzierte Purkinjenzell-EPSCs bei Wildtyp- und heterozygoten R552H-Mäusen	32
Abbildung 4.7: Langzeitdepression bei Wildtyp-Mäusen	34
Abbildung 4.8: Langzeitdepression bei heterozygoten R552H-Mäusen	35
Abbildung 4.9: Verwendete Datenpunkte zur Analyse der Langzeitdepression	36
Abbildung 4.10: Vergleich der Langzeitdepression bei Wildtyp- und heterozygoten R552H-Mäusen	37
Abbildung 4.11: Verwendete Datenpunkte zur Analyse der Langzeitdepressionsentstehung	38
Abbildung 4.12: Paarpulsbahnung an der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse	39
Abbildung 4.13: Paarpulsbahnung bei Wildtyp- und heterozygoten R552H-Mäusen	40
Abbildung 4.14: Paarpulsverhältnis bei Wildtyp- und heterozygoten R552H-Mäusen	41

1 Einleitung

Sprache ist ein wesentliches Merkmal des Menschen und macht ihn einzigartig (Pinker 1994). Die Generierung und der Austausch komplexer Informationen durch Sprache beruht dabei auf anatomischen Besonderheiten und feinmotorischen Fähigkeiten, welche andere Primaten als nächste Verwandte des Menschen nicht aufweisen (Lieberman 1984). Bisher ist wenig bekannt über die zugrunde liegenden Mechanismen von Sprache. In den letzten Jahrzehnten wurden jedoch Hinweisen auf die Beteiligung einzelner Gene an Sprachstörungen nachgegangen, in der Hoffnung, die Gründe eben dieser Sprachstörungen zu verstehen und – viel bedeutender – das Verständnis für die biologischen Grundlagen des normalen Spracherwerbs voranzubringen (Plomin et al. 2009).

1.1 KE-Familie

1990 wurden bei einer Londoner Großfamilie, in der Literatur als KE-Familie* bekannt, über drei Generationen Familienmitglieder mit einer besonderen Sprachstörung identifiziert (Gopnik 1990; Abbildung 1.1). Die Sprachstörung tritt bei allen betroffenen Familienmitgliedern gleichförmig und beständig auf und ist charakterisiert durch eine orofaziale Dyspraxie. Die betroffenen Familienmitglieder haben Schwierigkeiten bei der Kontrolle und Koordination ihrer orofazialen Muskulatur, was ihnen das fließende Sprechen unmöglich macht. Außerdem zeigen sie Beeinträchtigungen beim Sprachverständnis und beim Schreiben (Fletcher 1990; Vargha-Kadem 1990; Watkins et al. 2002a).

Kernspintomographische Untersuchungen an betroffenen Familienmitgliedern ergaben einige anatomische Auffälligkeiten: Sie zeigten beidseitig deutlich weniger graue Substanz im Kopf des Nucleus caudatus, in Gebieten des sensomotorischen Kortex, im Gyrus temporalis inferior sowie im Lobus VIIB und VIIIB des Kleinhirns (Vargha-Khadem et al. 1998; Watkins et al. 2002b; Belton et al. 2003). Die betroffenen Familienmitglieder hatten außerdem deutlich mehr graue Substanz in der vorderen Insula beidseits, im linken Gyrus frontalis inferior, im Putamen, im Motorkortex beidseits, im rechten Lobus posterior VI des Kleinhirns, im Cortex

* Die KE-Familie ist benannt nach den Initialen der Großmutter.

occipitoparietalis medialis links bzw. unsicher beidseits (Watkins et al. 2002b). Die Sprachstörung geht also mit Veränderungen verschiedener Regionen des Gehirns, unter anderem des Kleinhirns einher. Die Sprachstörung tritt dabei bei allen betroffenen Familienmitgliedern in stets der gleichen Form auf, sodass bei allen die gleiche Ursache der Störung vermutet werden kann. Diese Ursache könnte Hinweise auf mögliche Faktoren geben, die beim Menschen zur Sprachproduktion und zum Sprachverständnis beitragen. Somit bietet die KE-Familie die einzigartige Möglichkeit, die Grundlagen für Sprache anhand einer vererbten Störung zu betrachten. Die KE-Familie besteht aus 37 Mitgliedern, von denen fünfzehn sprachgestört sind.

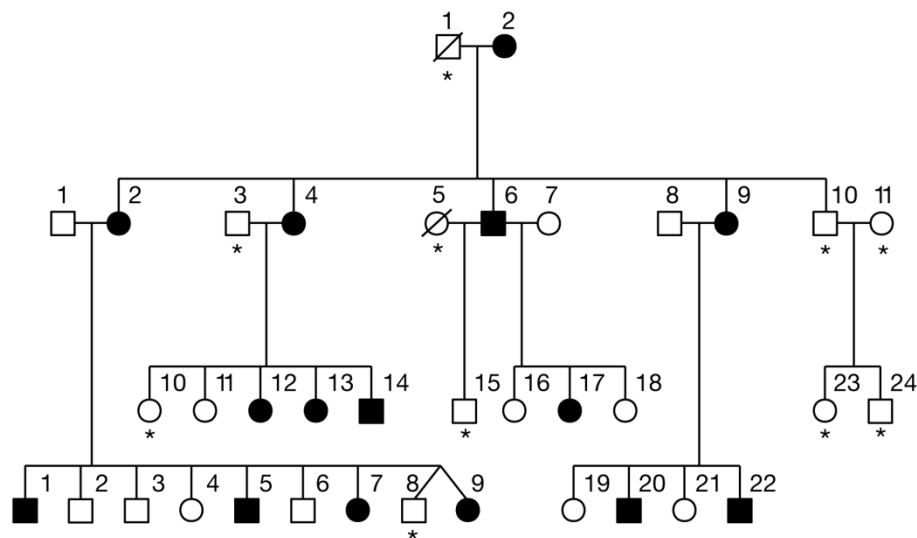


Abbildung 1.1: Stammbaum der KE-Familie

Die Abbildung zeigt den Familienstammbaum der KE-Familie. Die betroffenen Mitglieder sind durch ausgefüllte Symbole dargestellt. Die mit Sternchen gekennzeichneten Mitglieder wurden nicht genetisch untersucht. Quadrate stellen männliche, Kreise weibliche Mitglieder dar. Verstorbene Familienmitglieder wurden mit einer Linie durch das Symbol gekennzeichnet. Λ = zweieiige Zwillinge. Aus Lai et al. 2001.

1.2 FoxP2-Gen

Bei Untersuchungen am Genom aller betroffenen KE-Familienmitglieder wurde eine Veränderung auf Chromosom 7 in der Region 7q31 gefunden (Fisher et al. 1998). Es handelt sich bei der Sprachstörung der KE-Familie somit um eine monogene Erbkrankheit. 2001 wurde von Lai et al. das FoxP2-Gen in der Region 31.2 auf dem langen Arm von Chromosom 7 lokalisiert (Abbildung 1.2). Das FoxP2-Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, im Bereich der Exons 12 bis 14 befindet

sich die Forkhead-Domäne (*forkhead box*, FOX). Diese Region kodiert die Bindungsstelle des FoxP2-Proteins (Aminosäuren 508 bis 584, MacDermot et al. 2005), mit welcher es sich als Promotor an die DNS anderer Gene anlegt und deren Transkription reguliert.

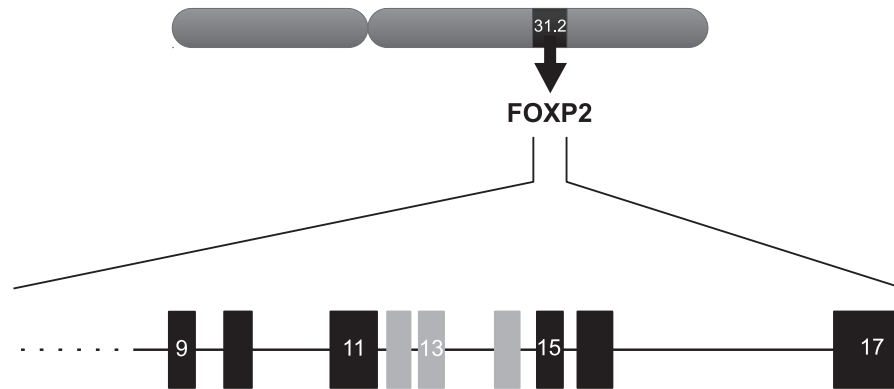


Abbildung 1.2: FoxP2-Gen

Das Fox-P2-Gen liegt auf Position 31.2 des langen Arms von Chromosom 7. Die Exons des FoxP2-Gens sind als Rechtecke, die Introns als vertikale Striche dargestellt. Die Forkhead-Domäne befindet sich im Bereich der Exons 12 bis 14 des FoxP2-Gens (hellgrau).

In dieser Forkhead-Domäne, im Exon 14, haben alle betroffenen Mitglieder der KE-Familie eine Punktmutation (Abbildung 1.3). Diese Mutation tritt dabei bei den Familienmitgliedern heterozygot auf und befindet sich im 553. Triplet (CGT), welches die Aminosäure Arginin codiert. Durch die Punktmutation wird die Base Guanin durch Adenin ersetzt. Das neue Triplet CAT codiert nun statt Arginin (abgekürzt mit R) die Aminosäure Histidin (H). Diese Substitution wird daher als R553H bezeichnet. Der Austausch dieser Base im FoxP2-Protein führt zu gestörten DNS-Bindungs- und Transaktivierung-Eigenschaften und bei den betroffenen Mitgliedern der KE-Familie letztlich zu der Sprachstörung (Lai et al. 2001).

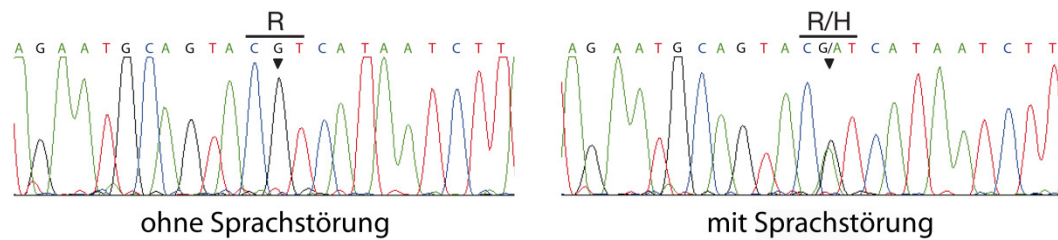


Abbildung 1.3: Mutation der KE-Familie

Die Sequenzierung der FoxP2-Exons zeigte bei den KE-Familienmitgliedern mit Sprachstörung einen Basenaustausch von G zu A im 553. Triplet, welches zu einer Substitution der Aminosäure Arginin (R) durch Histidin (H) führt. Alle betroffenen Familienmitglieder sind heterozygot für diese R553H-Mutation. Die gesunden Familienmitglieder sind homozygot für die Normvariante (R553). Aus Lai et al. 2001.

Das in der Literatur (Tuteja und Kaestner 2007a) seither mit Sprache in Verbindung gebrachte FoxP2-Gen ist jedoch nicht spezifisch für den Menschen. Das Gen kommt in vielen Organismen, zum Beispiel bei Nagetieren, vor und ist dabei überraschenderweise hoch konserviert. Abgesehen von den funktional untergeordneten Polyglutamin-Ketten unterscheidet sich das menschliche FoxP2-Gen nur in drei Basen von dem Ortholog der Maus und in nur zwei Basen von dem Ortholog bei Schimpanse und Gorilla (Abbildung 1.4). Das FoxP2-Gen ist damit eines der höchst konservierten Gene, die man beim Vergleich von Mensch und Nagetier bisher gefunden hat (Enard et al. 2002).

Es ist also erstaunlich, dass ein Gen, welches bei verschiedenen Arten wie Mensch, Affe und Maus fast identisch vorliegt, eine Rolle bei der Sprache spielt und zu einer gravierenden Sprachstörung führt, sobald nur eine Base verändert ist.

Human	MMQESATETI	SNSSMNQNGM	STLSSQLDAG	SRDGRSSGDT	SSEVSTVELL	HLQQQALQA	ARQLLQQQT	SGLKSPKSSD	KQRPLQVPVS	VAMMTPQVIT
Chimp
Gorilla
Orang
Rhesus
Mouse
Human	PQQMQQILQQ	QVLSPPQLQA	LLQQQAVML	QQQQLQEFYK	KQQEQHLHL	Q	Q	Q	Q	Q
Chimp
Gorilla
Orang
Rhesus
Mouse
Human	Q	LAAQQLVFQQ	QLLQMQQLQQ	QQHLLSLRQ	GLISIPPGQA	ALPVQSLPQA	GLSPAETIQL	WKEVTGVHSM	EDNGIKHGGL	DLTTNNSST
Chimp
Gorilla
Orang
Rhesus
Mouse
Human	TSSNTSKASP	PITHHSIVNG	QSSVLSARRD	SSSHEETGAS	HTLYGHGCK	WPGCESICED	FGQFLKHLNN	EHALDDRSTA	QCRVQMQRVQ	QLEIQLSKER
Chimp
Gorilla
Orang
Rhesus
Mouse
Human	ERLQAMMTHL	HMRPSEPKPS	PKPLNLVSSV	TMSKNMLET	PQSLPQTPTT	PTAPVTPITQ	GPSVITPASV	PNVGAIRRRH	SDKYNIPMSS	EIAPNYEFYK
Chimp
Gorilla
Orang
Rhesus
Mouse
Human	NADVRRPFPTY	ATLIRQAIME	SSDRQLTNE	IYSWFTRTFA	YFRRNAATWK	NA ^R RHNLSLH	KCFVRVENVK	GAVWTVDEVE	YQKRRSQKIT	GSPTLVKNIP
Chimp
Gorilla
Orang
Rhesus
Mouse
Human	TSLGYGAALN	ASLQAALAES	SLPLLSNPGL	INNASSGLLQ	AVHEDLNGSL	DHIDSNNGSS	PGCSPQPHIH	SIHVKEEPVI	AEDEDCPMSL	VTTANHSPEL
Chimp
Gorilla
Orang
Rhesus
Mouse
Human	EDDREIEEEP	LSEDL*								
Chimp								
Gorilla								
Orang								
Rhesus								
Mouse								

Abbildung 1.4: Aminosäure-Sequenz des FoxP2-Gens

Die Abbildung zeigt die Anordnung der FoxP2-Aminosäure-Sequenzen, abgeleitet aus der FoxP2-DNS-Sequenz, für Mensch, Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan, Rhesusaffe und Maus. Die Polyglutaminketten (Q) und die Forkhead-Domäne sind grau unterlegt, die von der menschlichen DNS abweichenden Aminosäuren bei Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan, Rhesusaffe, Maus sind jeweils nicht unterlegt umrahmt. Der Ort der KE-Mutation ist durch einen roten Kreis gekennzeichnet. Abgesehen von der Polyglutaminkette weichen die Sequenzen von Schimpanse, Gorilla und Rhesusaffe sowie von Orang-Utan und Maus nur für zwei bzw. drei Aminosäuren von der menschlichen FoxP2-DNS-Sequenz ab. Aus Enard et al. 2002, Hervorhebung (roter Kreis) durch Autor.

1.2.1 Expressionsorte von FoxP2

Untersuchungen an prä- und postnatalen Mäuse- bzw. postmortalen Menschenhirnschnitten mit in-situ-Hybridisierung, RT-PCR und Immunhistochemie zur Darstellung von FoxP2 zeigten viele Expressionsorte. Außerhalb des Gehirns wird FoxP2 in den Lungen und im Ösophagus exprimiert (Shu et al. 2007), im Gehirn vorwiegend in den Basalganglien – vor allem im Striatum –, im Thalamus, in der unteren Olive und im Kleinhirn und dort vor allem in den Purkinjellen (Lai et al. 2003; Ferland

et al. 2003; Abbildung 1.5). In all diesen Regionen zeigen die betroffenen KE-Familienmitgliedern in der Kernspintomographie Veränderungen (Vargha-Khadem et al. 1998; Watkins et al. 2002b; Belton et al. 2003) und eben diese Regionen werden mit dem Erlernen von Motorik bzw. Feinmotorik in Verbindung gebracht (Middleton und Strick 2000; Vargha-Khadem et al. 2005): Die Basalganglien sind direkt mit dem motorischen Kortex verschaltet (kortikostriataler Schaltkreis); Das Kleinhirn nimmt über den olivocerebellärer Schaltkreis Einfluss auf feinmotorische Bewegungen. Beide Schaltkreise regulieren beim Sprechen die orofaziale Feinmotorik. FoxP2 scheint somit einen Einfluss auf die Entwicklung dieser kortikostriatalen und olivocerebellären Schaltkreise auszuüben. Eine Störung dieser Schaltkreise durch eine Veränderung im FoxP2-Gen könnte Grundlage für die Sprachstörung der KE-Familie sein.

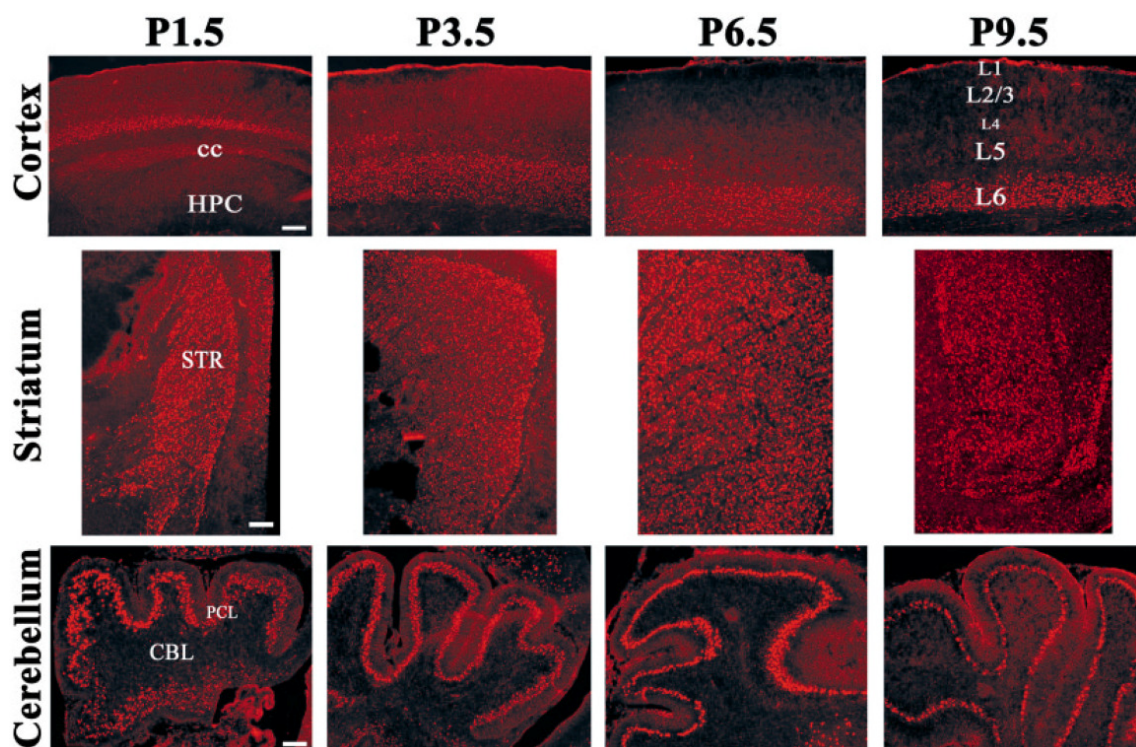


Abbildung 1.5: Expressionsorte des FoxP2-Proteins

Die Abbildung zeigt Mikroaufnahmen von Hirnschnitten von Mäusen im Alter von 1½, 3½, 6½ und 9½ Tagen. Das FoxP2-Protein (rot angefärbt) wird in allen dargestellten Entwicklungsstufen im Kortex (vor allem in der kortikalen Schicht 6), im Striatum und im Kleinhirn (vor allem in den Purkinjellen der Kleinhirnrinde) exprimiert. Skalierungsbalken 100 µm. CBL: Cerebellum, cc: Corpus callosum, HPC: Hippokampus, L1-L6: Kortikale Schichten 1-6, PCL: Purkinjell-Schicht, STR: Striatum. Aus Ferland et al. 2003.

1.2.2 Hypothese zur Funktion des FoxP2-Gens

FoxP2 gehört zur FOX-Familie, einer Gruppe von Genen mit einer Forkhead-Domäne (*forkhead box*, FOX), die Transkriptionsfaktoren kodieren und so die Expression weiterer Gene regulieren (Tuteja und Kaestner 2007a, 2007b). Studien zur Identifizierung von FoxP2-regulierten Genen haben eine Vielzahl von Genen benannt. Es gibt Hinweise darauf, dass das FoxP2-Protein an zirka 300 bis 400 Promoter-Regionen des menschlichen Genoms bindet (Vernes et al. 2007). Der Effekt von FoxP2 hängt dabei stark von dem Gewebe und dem Entwicklungszeitpunkt ab (Spiteri et al. 2007; Vernes et al. 2007; Konopka et al. 2009). FoxP2 kann somit auf eine Vielzahl von biologischen Schritten Einfluss nehmen, welche ihrerseits die Sprachentwicklung und den Spracherwerb beeinflussen können. Die Funktion vom FoxP2-Gen lässt sich somit nicht auf eine einzelne, spezifische reduzieren, sondern scheint sehr vielfältig und komplex zu sein. Die Untersuchungen an der KE-Familie weisen darauf hin, dass zwei funktionsfähige FoxP2-Gene für eine normale Sprachentwicklung beim Menschen essentiell sind. Dies lässt die Spekulation zu, dass die zwei oder drei Basen, die den Unterschied im des menschlichen FoxP2-Gen zum Schimpansen oder zur Maus ausmachen, die Fähigkeit zum Sprechen und zur Sprachentwicklung beim Menschen entscheidend beeinflusst haben (Vargha-Khadem et al. 2005).

1.3 Modellsystem Maus

Für tiefergehende Untersuchungen zur Funktion von FoxP2 wurden Untersuchungen an Modellsystemen durchgeführt. Für den Einsatz eines Mausmodells sprechen folgende Gründe: Zum einen unterscheiden sich das FoxP2-Gen von Maus und Mensch nur in drei Aminosäuren (Enard et al. 2002). Und auch die FoxP2-Expressionsmuster bei Maus und Mensch sind sich sehr ähnlich (Lai et al. 2003; Ferland et al. 2003). Eine etablierte Technik ist zum anderen die Erzeugung von Knockout-Mausstämmen, bei denen ein Gen oder ein bestimmter Teil eines Gens ausgeschaltet ist. Von den Folgen dieser Genom-Veränderung können dann Rückschlüsse auf die Funktion des ausgeschalteten Teils möglich sein.

1.3.1 Mausmodell mit ausgeschaltetem FoxP2-Gen

2005 wurden Mäuse generiert, bei denen Teile der Forkhead-Domäne des FoxP2-Gens, die Exons zwölf und dreizehn, ausgeschaltet waren, sogenannte FoxP2-Knockout-Mäuse (Shu et al. 2005; Abbildung 1.6).

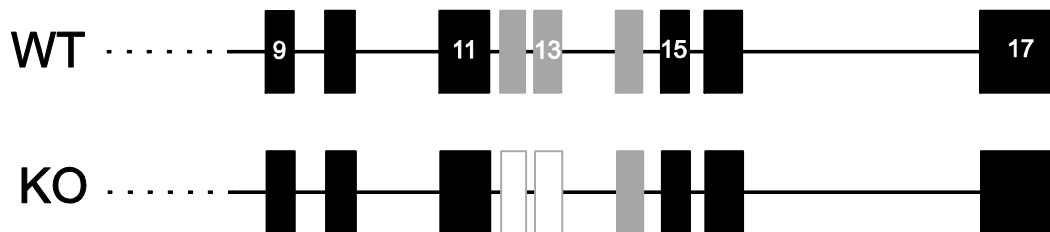


Abbildung 1.6: Gendefekt der FoxP2-Knockout-Maus

Die Abbildung zeigt die Veränderungen im FoxP2-Gen bei der von Shu et al. (2005) generierten Knockout-Maus (KO) im Vergleich zur Wildtyp-Variante (WT). Die ausgeschalteten Exons 12 und 13 (weiße Rechtecke) sind Teile der Forkhead-Domäne (hellgrau). Die Exons sind als Rechtecke, die Introns als vertikale Striche dargestellt.

Es wurden homozygote und heterozygote Knockout-Mäuse bezüglich ihrer Entwicklung und Ultraschallvokalisation* untersucht und ihr Gehirn auf histologische Veränderungen hin analysiert. Hinsichtlich der Entwicklung hatten die homozygoten Knockout-Mäuse schwerwiegende Störungen der Motorik und verstarben frühzeitig, zirka drei Wochen nach Geburt. Die heterozygoten Mäuse zeigten dagegen nur eine leichte Entwicklungsverzögerung. Bei den homozygoten Knockout-Mäusen fehlte die Ultraschallvokalisation bei Entfernen des Jungtieres von der Mutter. Bei den heterozygoten Knockout-Mäusen war die Ultraschallvokalisation deutlich verändert. Die histologische Analyse der Mäusegehirne ergab Veränderungen im Kleinhirn, die bei den homozygoten stärker ausgeprägt waren als bei den heterozygoten Knockout-Mäusen: Die Dendritenbäume der Purkinjezellen zeigten weniger Verzweigungen und verliefen oft schräg. Dadurch war die Molekularschicht dünner. Auch zeigten sich statt der normalen einzelnen Schicht mehrere Purkinjezellschichten sowie ektope Purkinjezell-Körper in der Körnerzellschicht (Abbildung 1.7).

* Der Begriff bezeichnet die Fähigkeit, Rufe im Ultraschallbereich auszusenden.

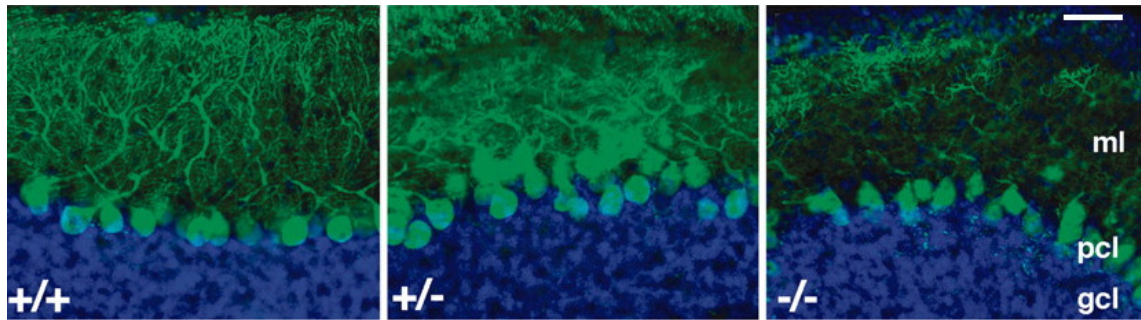


Abbildung 1.7: Purkinjezell-Anordnung der FoxP2-Knock-out-Mäuse

Die Abbildung zeigt immunhistologische Färbungen vom Kleinhirnkortex mit Calbindin (grün) und DAPI Kernfärbung (blau) bei Wildtyp- (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) FoxP2-Knockout-Mäusen im Alter von 17 Tagen. Bei den heterozygoten und homozygoten Knockout-Mäusen ist die typische einreihige Anordnung der Purkinjezellen (grün) aufgehoben. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verlaufen die Dendritenbäume der Purkinjezellen schräger. Die Veränderungen sind bei den homozygoten Knockout-Mäusen stärker ausgeprägt als bei den heterozygoten. Skalierungsbalken 50 µm. gcl: Körnerzellschicht, pcl: Purkinjezell-Schicht, ml: Molekularschicht. Aus Shu et al. 2005.

Die Untersuchungen an den Knockout-Mäusen sprechen dafür, dass FoxP2 Einfluss zum einen auf die Ultraschallvokalisation und zum anderen auf die Kleinhirnentwicklung bei Mäusen nimmt (Shu et al. 2005).

Diese Untersuchungen lassen jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf die vorgefundene Sprachstörung der KE-Familie zu. Durch die Ausschaltung ganzer Exons wurde in der FoxP2-Knockout-Maus ein großer Teil der Forkhead-Domäne ausgeschaltet und somit die Promotor-Funktion des FoxP2-Proteins stark beeinträchtigt – im Gegensatz zur Punktmutation der KE-Familie.

1.3.2 Mausmodell mit KE-Familien-Punktmutation im FoxP2-Gen

Um die Mechanismen der Sprachstörung der KE-Familie tiefergehend zu untersuchen, wurde ein Mausmodell generiert, welches genau die KE-Punktmutation trägt, eine sogenannte Knockin-Maus. Da bei Mäusen das FoxP2-Gen eine Aminosäure kürzer ist als beim Mensch muss dafür die Base Guanin nicht im 553. Triplet, sondern im 552. Triplet durch Adenin ersetzt werden. Eine R552H-Mutation im FoxP2-Gen der Maus entspricht somit der R553H-Mutation der KE-Familie. Diese Maus wurde 2007 von der Arbeitsgruppe um Simon Fisher in Oxford hergestellt (Groszer et al. 2008). Die FoxP2-R552H-Knockin-Maus (Abbildung 1.8) ist damit

das erste Tiermodell, welches die identische Punktmutation trägt wie die KE-Familie.

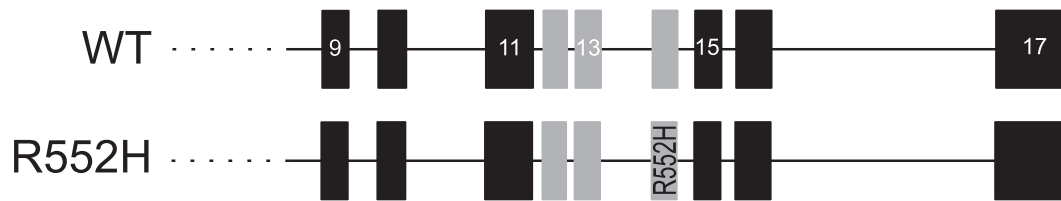


Abbildung 1.8: FoxP2-Gen der R552H-Maus

Die Abbildung zeigt die Veränderungen im FoxP2-Gen bei der R552H-Maus (R552H) im Vergleich zur Wildtyp-Variante (WT). Die Maus trägt in der Forkhead-Domäne (hellgrau) des FoxP2-Gens im 552. Triplet des Exons 14 die KE-Punktmutation (R552H). Die Exons sind als Rechtecke, die Introns als vertikale Striche dargestellt. Modifiziert nach Groszer et al. 2008.

Untersuchungen zur Entwicklung dieser Mäuse zeigten, dass homozygote R552H-Mäuse genauso wie die Knockout-Mäuse eine verkürzte Lebensdauer hatten und zirka drei bis vier Wochen nach der Geburt verstarben. Heterozygote R552H-Mäuse zeigten hingegen keine Auffälligkeiten in der Überlebenszeit (Groszer et al. 2008). Bei morphologischen Untersuchungen der Orte, an denen FoxP2 exprimiert wird, ergaben sich für homozygote und heterozygote Mäuse keine Auffälligkeiten in Kortex, Striatum und Thalamus. Das Kleinhirn war bei heterozygoten Tieren ebenfalls unauffällig mit unveränderter Kleinhirngröße, Fältelung oder Schichtung des Kleinhirnkortex. Homozygote R552H-Mäuse zeigten hingegen eine reduzierte Kleinhirngröße und geringere Kleinhirn-Faltung bei normaler Purkinjzell-Anordnung (Groszer et al. 2008; Abbildung 1.9).

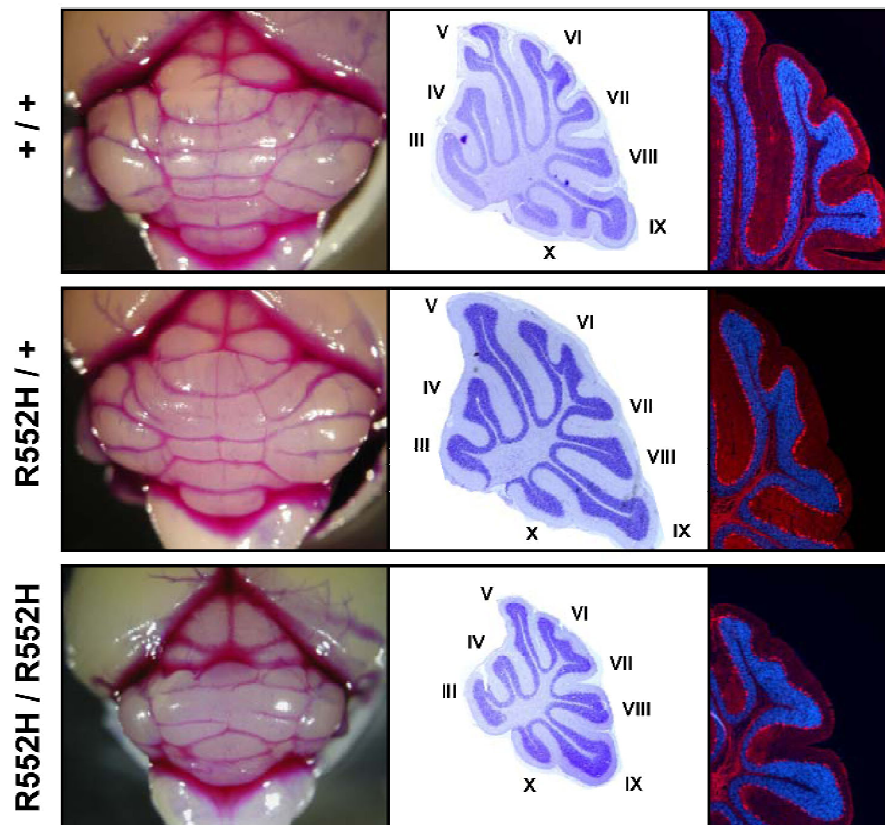


Abbildung 1.9: Kleinhirn-Morphologie der R552H-Mäuse

Die Abbildung zeigt die Kleinhirn-Morphologie in 21 Tage alten Wildtyp-Mäusen (oben), heterozygoten (Mitte) und homozygoten (unten) R552H-Mäusen. Die Homozygoten haben ein kleineres Kleinhirn (linke Spalte) und zeigen weniger Furchungen (mittlere Spalte, Vermislappen III-X, Cresyl-Violett-Färbung). Wie die Immunhistologie-Färbung (rechte Spalte, Vermis, rot: Anti-Calbindin, blau: DAPI Kernfärbung) zeigt, sind die Purkinjenzellen einreihig angeordnet. Die Heterozygoten zeigen keine Auffälligkeiten bezüglich Größe, Faltung oder Schichtung des Kleinhirns. Modifiziert nach Groszer et al. 2008.

Durch Generierung der R552H-Maus wurde die Möglichkeit geschaffen den Einfluss der Punktmutation im FoxP2-Gen der KE-Familie an einem Modellsystem Maus zu untersuchen. Neben Untersuchungen zur Morphologie und zum Verhalten sind damit erstmals auch Untersuchungen zu funktionalen Eigenschaften von sprachrelevanten Schaltkreisen möglich und sollten Hinweise auf Mechanismen liefern, die der Sprachstörung der KE-Familie zu Grunde liegen. Untersuchungen an der Mausmutante auf zellulärer Ebene stellen damit ein wichtiges Bindeglied zu den bisherigen Arbeiten zur Molekular- und Verhaltensbiologie der Sprachstörung der KE-Familie dar.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die elektrophysiologische Untersuchung des Einflusses der R552H-Mutation im FoxP2-Gen auf die synaptische Verschaltung im Kleinhirnkortex.

Für einen Einfluss von FoxP2 auf das Kleinhirn spricht folgendes: 1) Die KE-Familie zeigt morphologische Veränderungen im Kleinhirn (Vargha-Khadem et al. 1998; Watkins et al. 2002b; Belton et al. 2003) 2) Bisherige Arbeiten am Mausmodell zeigten ebenfalls morphologische Auffälligkeiten des Kleinhirns bei Veränderung des FoxP2-Gens (Shu et al. 2005; Groszer et al. 2008) 3) FoxP2 wird außerdem stark im Kleinhirn exprimiert (Lai et al. 2001; Ferland et al. 2003). Unklar ist bisher, welchen Einfluss FoxP2 auf funktionale Eigenschaften der Kleinhirneurone ausübt. Auch ist offen, zu welchen Veränderungen die R552H-Punktmutation im FoxP2-Gen, die im Zusammenhang mit Sprache steht (Tuteja und Kaestner 2007b), führt. Die Veränderungen könnten dabei vielfältig sein, von Entwicklungsstörungen und Veränderungen der Kanaleigenschaften bis hin zu Veränderungen der Verschaltung exzitatorischer bzw. inhibitorischer Synapsen.

Es erschien am erfolgversprechendsten, die exzitatorische Verschaltung des Kleinhirnkortex zu untersuchen, da diese sehr anfällig für Veränderungen im Genom zu sein scheint: So kommt es bei vielen Mausmutanten zu einer multiplen Kletterfaser-Innervation (Kano et al. 1997; Kano et al. 1998; Ichikawa et al. 2002) und zu einer Veränderung der Plastizität an den erregenden Eingängen der Purkinjezelle, den Parallelfasern und der Kletterfaser (Aiba et al. 1994; Miyata et al. 2001; Matsukawa et al. 2003; Steinberg et al. 2006). Im Falle der R552H-Mutation erschienen ähnliche Veränderungen möglich, da FoxP2 im Kleinhirn vor allem in der Purkinjezelle und somit an einer Schlüsselstelle dieses erregenden Schaltkreises exprimiert wird (Ferland et al. 2003).

Zur Untersuchung der FoxP2-R552H-Knockin-Maus sollten daher elektrophysiologische Untersuchungen am Kleinhirnkortex dieser Mausmutante durchgeführt werden und die zelluläre Verschaltung der erregenden Eingänge, der Parallelfasern und Kletterfasern, auf die Purkinjezelle untersucht werden. Bei diesen Schaltkreisen sollte zum einen betrachtet werden, ob die Zellen regelgerecht miteinander

verknüpft sind und eine Aktivierung der erregenden Eingänge typische postsynaptische Antworten in der Purkinjzelle hervorruft. Zum anderen sollten die plastischen Fähigkeiten dieses Schaltkreises auf Veränderungen untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die ersten elektrophysiologischen Untersuchungen an einer Maus, die die gleiche Mutation im FoxP2-Gen trägt wie die KE-Familie.

3 Material und Methoden

3.1 Kleinhirnkortex

Die Purkinjezellen, Kletterfasern und Parallelfasern, an denen diese Arbeit durchgeführt wurde, liegen im dreischichtigen Kleinhirnkortex (Abbildung 3.1).

Die Purkinjezellen fallen durch ihre großen Zellkörper auf. Diese liegen in der Purkinjezell-Schicht einreihig nebeneinander und sind mikroskopisch auch ohne Färben gut identifizierbar. Die Dendritenbäume der Purkinjezellen liegen flach aufgefächert in der Sagittalebene der Molekularschicht. Die Purkinjezell-Axone ziehen durch die Körnerzellschicht zu den tiefen Kleinhirnkernen. Die Purkinjezellen sind dabei die einzigen Ausgangsneurone der Kleinhirnrinde. Als erregende Afferenzen erhalten Purkinjezellen Eingänge von je einer Kletterfaser und zigtausend Parallelfasern.

Die Kletterfaser stammt aus Zellen der unteren Olive der Medulla oblongata. Jeweils eine Kletterfaser „klettert“ zum Dendritenbaum einer Purkinjezelle und innerviert dessen proximales Drittel über erregende Synapsen (Ito 1984).

Die Körnerzellen liegen in der inneren Zellschicht, der Körnerzellschicht. Die Körnerzell-Axone ziehen in die Molekularschicht, teilen sich dort T-förmig in Parallelfasern und formen exzitatorische Synapsen am Purkinjezell-Dendritenbaum.

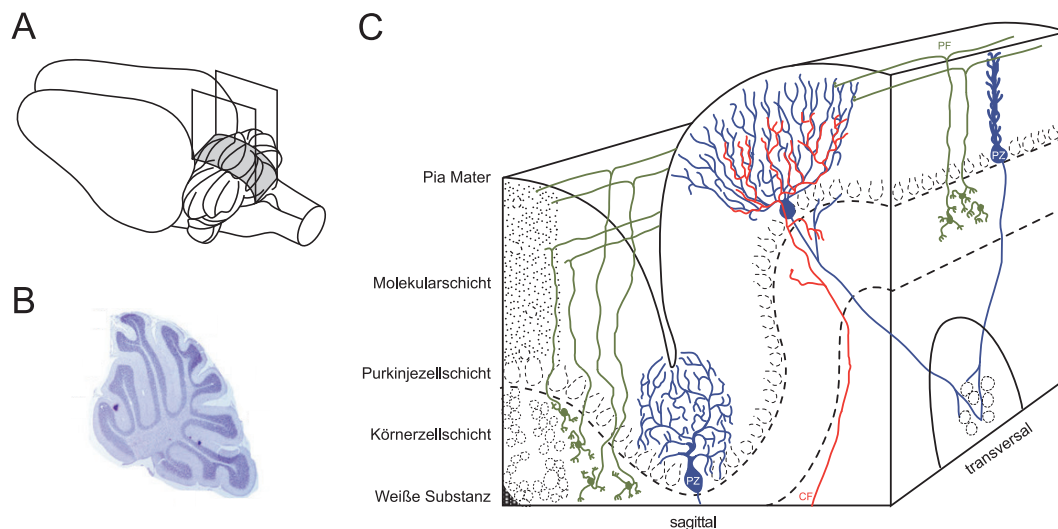


Abbildung 3.1: Aufbau des Kleinhirnkortex

A: Schematische Darstellung eines Mäusegehirns mit einer sagittalen Schnittebene im cerebellären Vermis. B: Die Schichten des Kleinhirnkortex sind im Schnitt-Präparat (Groszer et al. 2008) dieser Ebene durch die Cresyl-Violett-Färbung deutlich zu erkennen. C: Die schematische Darstellung des Kleinhirnkortex (modifiziert nach Eccles 1973) zeigt die Verschaltung erregender Neurone, Parallelfasern (PF, grün) und Kletterfasern (CF, rot) mit Purkinjezellen (PZ, blau). Die gestrichelten Linien zeigen die dreischichtige Einteilung in Molekularschicht, Purkinjezell-Schicht und Körnerzellschicht.

3.2 Akute cerebelläre Hirnschnittpräparate

Die Präparation akuter Hirnschnitte (Edwards et al. 1989; Abbildung 3.2) wurde an heterozygoten R552H-Mäusen* (C57 black 6/R552H) und an Wildtyp-Mäusen (C57 black 6/C57 black 6) durchgeführt. Dafür wurden Mäuse im Alter von 24 bis 28 Tagen mit Isofluran (Curamed, Karlsruhe, Deutschland) anästhesiert und dann dekapitiert. Anschließend wurden vorsichtig Kopfhaut, Schädelkalotte und Dura entfernt. Am freipräparierten Kleinhirn wurde der Vermis mit Hilfe eines Skalpells von den Kleinhirnhemisphären und dem Hirnstamm getrennt und zügig in eine eisgekühlte Ringerlösung (0-4 °C) gelegt, um das Gewebe herunterzukühlen. Der Präparationsvorgang dauerte dabei nicht länger als eine Minute um Gewebeschäden zu limitieren. Die Ringerlösung enthielt 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1,25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃ und 20 mM Glukose (pH von 7,4) und wurde stets mit Carbogen (ein Gemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid) begast (Edwards et al. 1989). Anschließend wurde der Vermis mit Gewebekleber (Histoarcyl, Aeculab AG, Tuttlingen, Deutschland) in der

* Freundlicherweise von Simon Fisher, Oxford (jetzt Nijmegen) zur Verfügung gestellt.

Schneidekammer fixiert und mit eisgekühlter Ringerlösung bedeckt. Parasagittale Schnitte mit einer Dicke von 200 μm wurden mit einem Vibratom (Microm HM 650 V, Wolldorf, Deutschland) erstellt und anschließend für 35 Minuten in einem Becherglas mit Haltevorrichtung, gefüllt mit 35 °C-warmer, Carbogen-begaster Ringerlösung inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur (20–22 °C) in der Ringerlösung aufbewahrt. Die Schnitte verblieben dort, bis einzelne Schnitte für die Messungen mittels einer großlumigen Pipette in die Badkammer des Messtandes gelegt wurden. Nach Transfer in die Badkammer wurden sie dort mittels eines Nylonfadengitters fixiert und mit stets frisch begaster Ringerlösung bei Raumtemperatur superfundiert (ca. 3 ml/min). Für alle Messungen enthielt die Ringerlösung zusätzlich 10 μM Bicucullin-Methiodid (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland). Diese Substanz inhibiert ionotropen γ -Amino-Buttersäure-Rezeptoren vom Typ A (GABA_A -Rezeptoren) und verhindert so eine Überlagerung der erregenden postsynaptischen Ströme (EPSCs, *excitatory postsynaptic currents*) durch inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs, *inhibitory postsynaptic currents*).

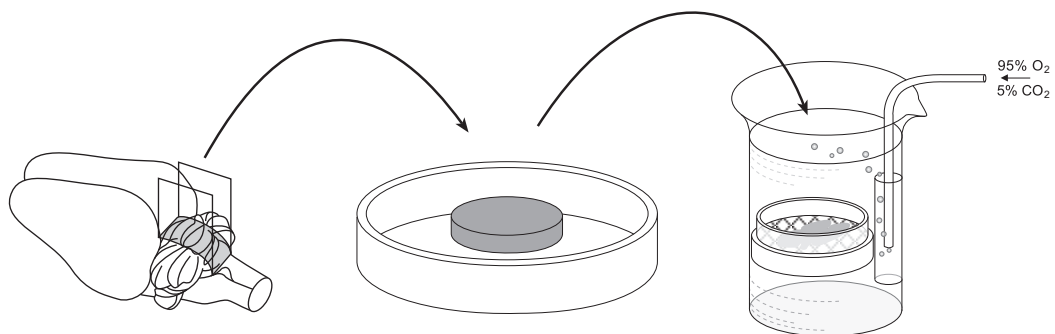


Abbildung 3.2: Schritte der Präparation akuter Hirnschnitte

Nach Freipräparation des Kleinhirns wird der Vermis von den Kleinhirnhemisphären durch sagittale Schnitte getrennt (links) und gekühlt. Anschließend wird der Vermis mit Gewebekleber in der Schneidekammer (Mitte) fixiert, geschnitten und in ein Becherglas mit Haltevorrichtung (rechts) transferiert, welches mit Carbogen-begaster (95 % O_2 , 5 % CO_2) Ringerlösung gefüllt ist. Nach ca. 35-minütiger Inkubation bei 35 °C werden die Schnitte in diesem Becherglas bei Raumtemperatur aufbewahrt. Modifiziert nach Plant et al. 1995.

3.3 Elektrophysiologie

3.3.1 Patch-Clamp-Technik an der Purkinjzelle

Die elektrophysiologischen Ableitungen erfolgten unter Anwendung der Patch-Clamp-Technik, welche von Neher und Sakmann (Neher und Sakmann 1976; Hamill et al. 1981) entwickelt wurde. Die dabei angewendeten Patchpipetten waren Glaskapillaren aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland), die mit einem vertikalen Ziehgerät (PC-10, Narishige, Tokyo, Japan) zur Beginn der Messungen frisch gezogen wurden. Gefüllt mit gefilterter (Nalgene Filter, 2 μm Porengröße, VWR, Darmstadt, Deutschland) Intrazellulärlösung, bestehend aus 150 mM Kaliumgluconat, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, 3 mM Mg-ATP, 0,3 mM GTP und 0,05 mM EGTA (pH 7,3; mit HCl eingestellt), hatten die Pipetten einen Widerstand von 4-6 M Ω (Edwards et al. 1989). In die Patchpipette wurde ein Silberchloriddraht gesteckt. Dieser diente als elektrischer Übergang von der Elektrolytlösung zum Verstärker. Eine dazugehörige Referenzelektrode, ebenfalls aus Silberchloriddraht, lag in der Ringerlösung der Badkammer. Anhand eines aufrechten Mikroskops (BX50WI, Olympus, Germany, ausgestattet mit einem 60 \times /0.9 NA Wasserimmersions-Objektiv) wurden die Purkinjzellen visuell identifiziert. Bis zum Erreichen der Zellmembran einer Purkinjzelle wurde auf die Patchpipette konstant ein leichter positiver Druck (ca. 20 mbar) über einen Schlauch appliziert, um Verschmutzungen der Pipettenspitze zu vermeiden. An der Membran angekommen entfernte dieser Druck außerdem mechanisch das lockere Gewebe über der Zielmembran. Die Pipettenspitze wurde dann langsam auf die Membran aufgesetzt (*on-cell* Konfiguration) und der Membranteil unter der Pipette durch leichten Sog in die Pipettenspitze angesogen. Daraufhin bildete sich eine spontane dichte Verbindung zwischen der inneren Glaspipettenoberfläche und der äußeren Membran (*cell-attached* Konfiguration). Der Widerstand dieser Verbindung lag im Bereich von einem bis mehreren Gigaohm, ein sogenannter Gigaseal. Der in der Pipettenspitze befindliche Membranfleck wurde nun mit kurzem, stark negativem Druck kombiniert mit einem kurzen starken Spannungspuls (800 μs , \sim 1V) aufgerissen. Die nun entstandene Verbindung vom Pipetteninneren mit dem Zellinneren (*whole-cell* Konfiguration; Abbildung 3.3) ermöglichte so einen elektrischen Zugang zur Zelle, um dessen elektrische Aktivität zu vermessen. Zellen, bei denen die Verbindung zur Zel-

le vor oder während der Messung nicht dicht genug war, wurden ab einem Leckstrom von -400 pA (bei -70 mV Haltepotential) verworfen.

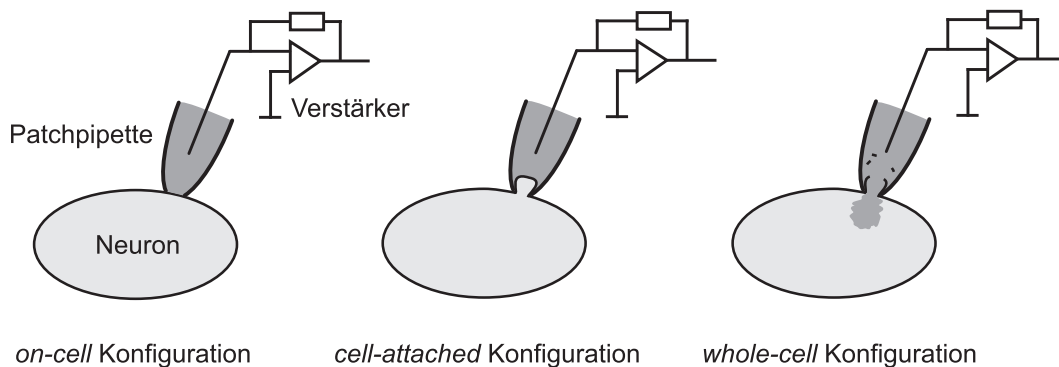


Abbildung 3.3: Generierung der *whole-cell* Konfiguration

Um eine elektrische Verbindung zwischen Pipetteninneren und Zellinneren zu schaffen, wird die Pipette zuerst auf die Membran der Zelle aufgesetzt (links) und ein kleiner Membranteil unter leichtem Sog in die Pipette gezogen (Mitte), sodass sich daraufhin eine spontane dichte Verbindung zwischen dem Pipettenrand und der Zellmembran bildet, der sogenannte Gigaseal. Anschließend wird dieser Membranteil durch einen starken Sog kombiniert mit einem kurzen Spannungspuls (800 μ s, ~ 1 V) aufgerissen (rechts) und die Pipettenlösung tauscht sich mit dem Zellinneren aus.

Der Widerstand dieser Verbindung ist ein mit dem Membranwiderstand in Serie geschalteter Widerstand und wird daher auch als Serienwiderstand bezeichnet. Dieser Serienwiderstand ist umso kleiner, je größer die Eröffnung der Zellmembran an der Verbindungsstelle ist. Dies hängt zum einen von dem Durchmesser der Pipetenspitze ab, zum anderen aber auch davon, ob die aufgerissenen Membranteile im Pipetteninneren die neu entstandene Öffnung teilweise wieder verschließen. Je größer der Serienwiderstand ist, desto mehr Spannung fällt an diesem Widerstand ab und desto weniger entspricht das Membranpotential der Kommandospannung. Außerdem werden die gemessenen Signale zeitlich verzerrt. Als Merkmal der Zugangsqualität wurde der Serienwiderstand während jedes Experiments durchgehend mittels eines -5 mV Testpulses ermittelt. Messungen an Zellen mit einem Serienwiderstand von größer als 30 M Ω vor oder während der Messung wurden verworfen. Um den Einfluss des Serienwiderstandes auf die Messergebnisse weiterhin zu verringern, wurde dieser mit Hilfe eines Patch-Clamp-Verstärkers zu 60 bis 70 Prozent kompensiert.

Zum Ableiten der elektrischen Aktivität konnte dann entweder in der Strom- oder in der Spannungsklemme gemessen werden. In der Stromklemme (*current clamp*) wird konstant Strom appliziert, um die Zellmembran in einem bestimmten Potentialbereich zu halten. Dabei werden Potentialänderungen über die Zellmembran durch Ionenströme zugelassen. Messungen im *current-clamp* Modus wurden durchgeführt, um überschwellige Signale (z. B. Aktionspotentiale) zu erlauben und zu messen. In der Spannungsklemme (*voltage clamp*) wird die Zelle auf eine Kommandospannung geklemmt und jene Ströme gemessen, die nötig sind, um die Zelle bei diesem Potential zu halten. Messungen im *voltage-clamp* Modus wurden durchgeführt um synaptische Ströme zu charakterisieren.

3.3.2 Stimulation der erregenden Eingänge der Purkinjzelle

Um die erregenden Eingänge der Purkinjzelle, die Kletterfasern und die Parallelfasern zu stimulieren, wurden Stimulationspipetten wie die Patchpipetten frisch gezogen und mit Ringerlösung gefüllt (Edwards et al. 1989). Nach Erreichen der *whole-cell* Konfiguration bei einer Purkinjzelle wurden abhängig von der Versuchsreihe eine oder zwei Stimulationspipetten in die Nähe dieser Purkinjzelle platziert. Zur Stimulation der Kletterfasern wurde eine Stimulationspipette zirka 20 μm von der Purkinjzelle entfernt in der Molekularschicht oder der Körnerzellschicht platziert. Zur Stimulation der Parallelfasereingänge wurde eine Stimulationspipette zirka 60 μm von der Purkinjzelle entfernt in der Körnerzellschicht platziert.

3.4 Datenerfassung

Die gemessenen Spannungen und Ströme wurden mittels EPC10-Verstärker (HEKA, Lambrecht, Deutschland) digitalisiert und über die Patchmaster-Software (ebenfalls HEKA) aufgezeichnet. Sie wurden in Echtzeit hinsichtlich der Spitzenamplitude analysiert, und während der laufenden Messung wurden diese Werte gegen die Zeit aufgetragen. Auch der Haltestrom bzw. die Kommandospannung und der Serienwiderstand wurden über die Software gespeichert und in Echtzeit gegen die Zeit aufgetragen. Zusätzlich wurden die Purkinjzell-Antworten graphisch dargestellt, um eine visuelle Kontrolle zu ermöglichen. Für die weitere Datenanalyse

wurden die gespeicherten Datensätze nach Igor Pro 6.0 (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) exportiert.

3.5 Statistik

Die Daten wurden auf Signifikanz getestet mittels t-Test für verbundene Stichproben und ANOVA. Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der Software SigmaStat 3.1 (Erkrath, Germany) durchgeführt.

4 Ergebnisse

Die hier vorgestellten Daten sind Teil der 2008 erschienenen Arbeit „Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech“ (Groszer et al. 2008), welche den Einfluss der R522H-Punktmutation auf das Modellsystem Maus untersucht. Die Kollaborationspartner der Veröffentlichung führten Untersuchungen zur Morphologie, zum Gewicht, zur Ultraschallvokalisation, zum Erlernen motorischer Abläufe und zur zellulären Plastizität im Striatum an R522H-Mäusen durch. Ich habe die im Folgenden beschriebenen elektrophysiologischen Messungen am Kleinhirn bei heterozygoten R522H-Mäusen durchgeführt und somit erstmals den Einfluss der KE-Mutation auf das Kleinhirn auf zellulärer Ebene untersucht. Dabei habe ich zuerst die beiden glutamatergen Afferenzen der cerebellären Purkinjezellen untersucht und diese anschließend auf Störungen der Kurz- und Langzeitplastizität. Alle hier dargestellten Experimente beinhalten Messungen an Wildtyp- bzw. heterozygoten R522H-Mäusen.

4.1 Charakterisierung erregender Eingänge der Purkinjezelle

Die Kletterfasern und die Parallelfasern bilden erregende Synapsen mit der Purkinjezelle. Bei den heterozygoten R522H-Mäusen wurden beide Eingänge auf Veränderungen in ihrer Verschaltung mit der Purkinjezelle untersucht. Zum Vergleich wurden die Experimente ebenfalls an gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

4.1.1 Charakterisierung der Kletterfaser-Purkinjezell-Synapsen

Im pränatalen Kleinhirn innervieren mehrere Kletterfasern eine Purkinjezelle. Innerhalb von zwei Wochen nach der Geburt werden überzählige Kletterfasereingänge an Purkinjezellen ausgeschaltet, sodass zirka 90 % der Purkinjezellen im gesunden ausgereiften Kleinhirn nur einen einzelnen, starken Kletterfasereingang haben (Hashimoto und Kano 2005). Bei unterschiedlichen Mausmutanten findet sich jedoch auch bei ausgereiften Tieren oft eine multiple Kletterfaserinnervation (Kano et al. 1997; Kano et al. 1998; Ichikawa et al. 2002; Hashimoto und Kano 2005). Deshalb wurden die heterozygoten R522H-Mäuse auf eine multiple Kletterfaserinnervation hin überprüft.

Dazu wurde eine Stimulationspipette an verschiedene Stellen mit einem Abstand von zirka 20 μm vom Purkinjell-Körper entfernt platziert (Abbildung 4.1). Die Antwortströme der Purkinjelle wurden für jede Platzierung der Stimulationspipette bei verschiedenen Stimulationsstärken im *current-clamp* Modus aufgenommen. Dies wurde an je zehn Zellen im Kleinhirnkortex von Wildtyp-Mäusen und heterozygoten R552H-Mäusen durchgeführt. In beiden Gruppen gab es dabei jeweils neunmal eine Innervation der Purkinjelle durch nur eine Kletterfaser und jeweils eine Purkinjelle mit multipler Innervation. Mit 90 % ist dies jeweils ein normaler Anteil (Hashimoto und Kano 2005).

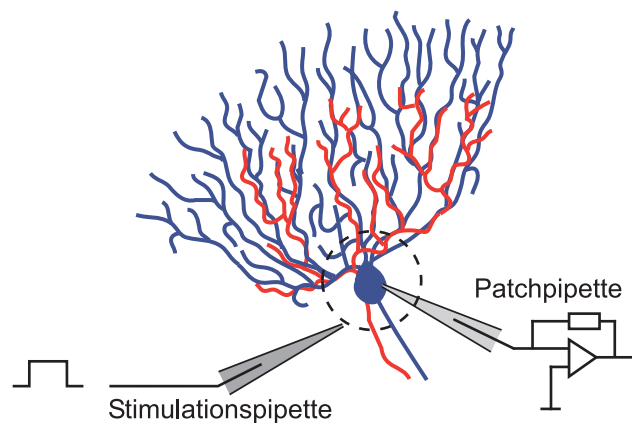


Abbildung 4.1: Stimulation der Kletterfaser

Zur Stimulation der Kletterfaser (rot) wurde zuerst eine Purkinjelle (blau) mit einer Patchpipette im *Current-clamp* Modus vermessen. Dann wurde die Stimulationspipette zirka 20 μm (in der Abbildung als gestrichelter Kreis dargestellt) vom Purkinjell-Körper entfernt platziert und das umliegende Gewebe mit steigender Stimulationsstärke extrazellulär stimuliert.

Wurden die Antworten der Purkinjelle bei den Zellen betrachtet, die zuvor eine intakte Eins-zu-eins-Verschaltung aufwiesen, so führte eine überschwellige Kletterfaserstimulation in beiden Gruppen zu typischen Aktionspotentialserien, den *complex spikes*, ausgelöst durch die Depolarisation des gesamten Purkinjell-Dendritenbaumes (Abbildung 4.2).

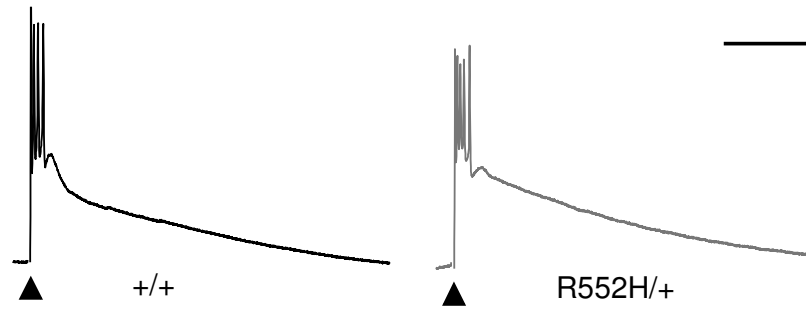


Abbildung 4.2: Kletterfaser-induzierte komplexe Aktionspotentiale (*complex spikes*)

Die Abbildung zeigt die postsynaptische Purkinjezell-Antwort nach Kletterfaserstimulation (▲) bei einer Wildtyp-Maus (links, schwarz) und bei einer heterozygoten R552H-Maus (rechts, grau). Beide Kurven zeigen als typische Kletterfaser-induzierte Antwort ein komplexes Aktionspotential bestehend aus mehreren einzelnen Aktionspotentialen. Skalierungsbalken 50 ms, 20 mV. Stimulationsartefakte wurden entfernt.

Es konnten also intakte Eins-zu-eins-Kontakte zwischen Kletterfaser und Purkinjezelle und typische *complex spikes* bei überschwelliger Kletterfaserstimulation bei den heterozygoten R552H-Mäusen nachgewiesen werden.

Liegt eine intakte Eins-zu-eins-Innervation vor, ist an dieser Synapse ein „Alles-oder-nichts“-Verhalten bei extrazellulärer Kletterfaserstimulation charakteristisch. Nur eine überschwellige Stimulation führt zu einer postsynaptischen Antwort, die bei Steigerung der Stimulationsstärke immer gleich ist. Um sicher zu gehen, dass bei den heterozygoten R552H-Mäusen eine intakte Kletterfaser-Innervation vorliegt, wurde die Kletterfaser-Purkinjezell-Verschaltung auf ein intaktes „Alles-oder-Nichts-Verhalten“ überprüft. Die Versuche dazu wurden im *voltage-clamp* Modus durchgeführt. Zur besseren Analyse der Kletterfaserantwort wurden die postsynaptischen Ströme durch Applikation des AMPA-Rezeptorblockers CNQX in submaximaler Konzentration (1-2 μM) reduziert (Abbildung 4.3).

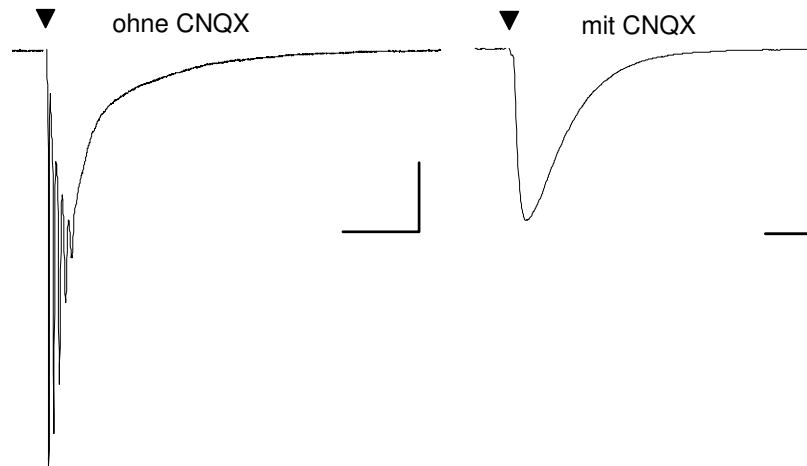


Abbildung 4.3: Wirkung von CNQX in submaximaler Dosierung auf die Kletterfaser-induzierte Purkinjenzell-Antwort in der Spannungsklemme

Die linke Kurve zeigt die postsynaptische Purkinjenzell-Antwort nach Kletterfaserstimulation (▼) im *voltage clamp*. Der resultierende komplexe Strom (*complex spike*) besteht aus mehreren einzelnen, nicht geklemmten, dendritischen Aktionsströmen. Nach Zufügen submaximaler Konzentration des AMPA-Rezeptorblockers CNQX reduzieren sich die zahlreichen Aktionspotentiale zu einem klemmbaren EPSC (rechts). Skalierungsbalken links 50 ms, 0,5 nA; rechts 10 ms, 1 nA. Stimulationsartefakte wurden entfernt.

Zur Erstellung von Reiz-Reaktions-Kurven (*stimulus-response curve*) der Kletterfaser-eingänge wurde die Kletterfaser mit steigender Stimulationsstärke von 0 μA bis 250 μA jeweils fünfmal im Abstand von mindestens fünf Sekunden extrazellulär stimuliert. Die Spitzenamplituden der aufgenommenen Purkinjenzell-EPSCs wurden berechnet und gegen die Stimulationsstärke aufgetragen. Diese Experimente wurden an zehn heterozygoten R552H-Mäusen und acht Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

Alle heterozygoten R552H-Mäuse und alle Wildtyp-Mäuse zeigten das typische „Alles-oder-Nichts“-Verhalten: Wurde für jede Messung die EPSC-Spitzenamplitude gegen die Stimulationsstärke aufgetragen, so ergab sich jeweils eine für das „Alles-oder-Nichts“-Verhalten charakteristische, biphasische Kurve. Eine unterschwellige Kletterfaserstimulation führte dann zu keinem EPSC („nichts“), eine überschwellige Stimulation führte unabhängig von der Stimulationsstärke zu einem gleichartigen EPSC („alles“) (Abbildung 4.4).

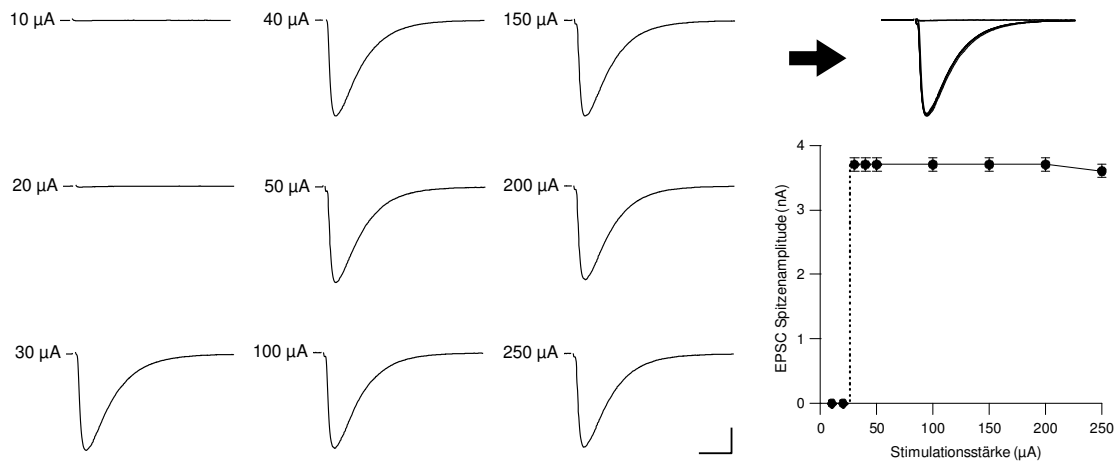


Abbildung 4.4: „Alles-oder-Nichts“-Verhalten des Kletterfasereingangs bei heterozygoten R552H-Mäusen

Die Abbildung zeigt beispielhaft das „Alles-oder-Nichts“-Verhalten der Kletterfaser-Purkinjenzell-Verschaltung bei heterozygoten R552H-Mäusen. Die neun dargestellten Kurven (links) zeigen für jede Stimulationsstärke (10-250 μA) die durch extrazelluläre Kletterfaserstimulation hervorgerufenen postsynaptischen Purkinjenzell-Ströme (EPSCs, Mittelwert von je fünf Messungen bei gleicher Stimulationsstärke) bei einer heterozygoten R552H-Maus. Ab einem Stimulationswert von 30 μA konnten EPSCs mit einer Maximalamplitude von zirka 3,7 nA ausgelöst werden, die sich übereinandergelegt (rechts oben) stark gleichen. Die untere rechte Abbildung zeigt diese Maximalamplituden (Mittelwert von fünf Messungen, +/- SD) über der Stimulationsstärke aufgetragen. Die gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert für die Stimulationsstärke an, ab der ein postsynaptischer Strom induziert werden konnte. Für die Messungen wurde der Badlösung der AMPA-Rezeptor-Blocker CNQX in submaximaler Konzentration (1-2 μM) beigefügt. Skalierungsbalken 10 ms, 1 nA. Die Stimulationsartefakte wurden entfernt.

Die heterozygoten R552H-Mäuse zeigten somit an der Kletterfaser-Purkinjenzell-Verschaltung ein intaktes „Alles-oder-Nichts“-Verhalten. Zusammengekommen mit dem oben gezeigten intakten Eins-zu-eins-Kontakten zwischen Kletterfaser und Purkinjenzelle sprechen diese Experimente für eine normale Kletterfaser-Purkinjenzell-Verschaltung der heterozygoten R552H-Mäuse.

4.1.2 Charakterisierung der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapsen

Die Stimulation von Parallelfasern ruft in der Purkinjenzelle postsynaptische EPSPs (exzitatorische postsynaptische Potentiale) hervor, die unter- oder überschwellig sein können. Überschwellige werden im Englischen *simple spikes* genannt. Die Antwort der Purkinjenzelle ist dabei abhängig von der Anzahl der stimulierten Parallelfasern und somit abhängig von der Stimulationsstärke (Abbildung 4.5).

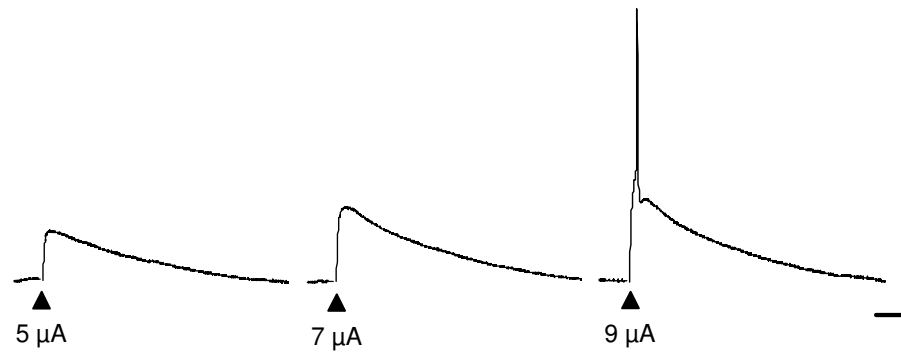


Abbildung 4.5: Parallelfaser-induzierte Purkinjezell-EPSPs bei steigender Stimulationsstärke

Die Abbildung zeigt postsynaptische EPSPs einer Purkinjezelle nach Parallelfaserstimulation mit steigender Stimulationsstärke. Die extrazelluläre Stimulation (▲) von Parallelfasern mit 5 μA ruft ein EPSP hervor (links). Durch Steigerung der Stimulationsstärke auf 7 μA werden mehr Parallelfasern rekrutiert und das EPSP wird größer (Mitte). Durch weitere Steigerung der Stimulationsstärke auf 9 μA wird ein Aktionspotential ausgelöst (rechts). Skalierungsbalken 20 ms, 10 mV. Stimulationsartefakte wurden entfernt.

Bei Mausmutanten zeigen sich selten Veränderungen der Parallelfasern, wenn der Kleinhirnkortex im histologischen Schnitt unauffällig ist. Die heterozygoten R552H-Mäuse zeigten keine histologischen Auffälligkeiten im Kleinhirnkortex (Groszer et al. 2008). Daher wurden zur Charakterisierung der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapsen dieser Mausmutante die Parallelfasern nur auf augenscheinliche Auffälligkeiten der Purkinjezell-Antworten hin untersucht. Dafür wurden Experimente im *voltage-Clamp* Modus durchgeführt. Um die Parallelfasern zu stimulieren, wurde eine Stimulationspipette zirka 60 μm von der Purkinjezelle entfernt in der Körnerzellschicht platziert. Die Parallelfasern wurden extrazellulär mit steigender Stimulationsstärke stimuliert und die resultierenden Purkinjezell-EPSCs aufgenommen.

Dabei zeigten sich bei den heterozygoten R552H-Mäusen wie bei den Wildtyp-Mäusen stimulationsstärke-abhängige EPSCs mit charakteristischem Kurvenverlauf (Abbildung 4.6). Innerhalb weniger Millisekunden nach Parallelfaserstimulation änderte sich der Grundstrom der gemessenen Purkinjezelle abhängig von der Stimulationsstärke um mehrere hundert Pikoampere. Nach Erreichen eines Spitzenwertes näherte sich der Strom innerhalb mehrerer hundertstel Sekunden wieder dem Ausgangswert.

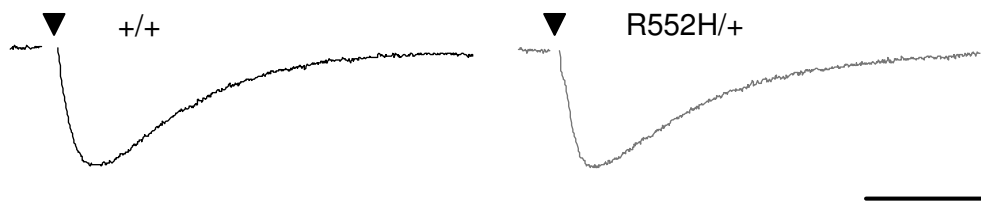


Abbildung 4.6: Parallelfaser-induzierte Purkinjenzell-EPSCs bei Wildtyp- und heterozygoten R552H-Mäusen

Die abgebildeten Beispielkurven zeigen die postsynaptischen EPSCs einer Purkinjenzelle nach Parallelfaserstimulation (▼) durchgeführt an Wildtyp-Mäusen (+/+, links) und heterozygoten R552H-Mäusen (R552H/+, rechts). Das postsynaptische EPSC der Purkinjenzelle einer heterozygoten R552H-Maus zeigt dabei wie bei der Wildtyp-Maus einen für eine Parallelfaserstimulation typischen Kurvenverlauf. Skalierungsbalken 20 ms, 50 pA. Stimulationsartefakte wurden entfernt.

Durch Parallelfaserstimulation konnten bei heterozygoten R552H-Mäusen in der Purkinjenzelle normale EPSCs induziert werden. Dies spricht für eine normale Verschaltung zwischen Parallelfasern und Purkinjenzelle.

4.2 Synaptische Plastizität an der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse

Bei Mausmutanten ist oft die Modulationsfähigkeit der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse verändert (Aiba et al. 1994; Miyata et al. 2001; Matsukawa et al. 2003; Steinberg et al. 2006). Anhand von etablierten Protokollen wurden daher an dieser Synapse Langzeit- und Kurzzeitplastizität induziert, um die heterozygoten R552H-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf Veränderungen in der Plastizität zu untersuchen.

4.2.1 Langzeitdepression an der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse

Langzeitplastizität ist eine Änderung der Übertragungsstärke, die viele Minuten bis Stunden andauert. An der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse wird klassischerweise durch simultane Stimulation von Parallelfasern und der Kletterfaser eine stabile Verkleinerung des Parallelfaser-induzierten Purkinjenzell-EPSP hervorgerufen (Langzeitdepression, LTD, Ito 2001). Diese LTD-Induktion wurde an sieben Purkinjenzellen von heterozygoten R552H-Mäusen und an zwölf Purkinjenzellen von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Experimente wurden dabei im *current-clamp* Modus

durchgeführt. Zur Stimulation der Parallelfasern wurde eine Stimulationspipette in der Körnerzellschicht und zur Stimulation der Kletterfaser eine Stimulationspipette in der Molekularschicht platziert. Zur Induktion von Langzeitdepression diente ein etabliertes Protokoll mit drei Messphasen (Ausgangsphase, Induktionsphase und Kontrollphase). In der Ausgangsphase wurden die Parallelfasern mit 0,2 Hz stimuliert. Um den Grundwert der Antwortamplituden zu bestimmen, wurden die Spitzenamplituden der EPSPs gemessen. Diese mussten für mindestens fünf Minuten eine stabile Größe haben. In der Induktionsphase wurden die Parallelfasern und die Kletterfaser für fünf Minuten simultan mit 1 Hz stimuliert (Karachot et al. 1994), um eine LTD zu induzieren. In der Kontrollphase wurde das Ausmaß der LTD-Induktion auf die Antwortamplituden gemessen. Dazu wurden die Parallelfasern für weitere 40 Minuten mit 0,2 Hz stimuliert und die Spitzenamplituden der resultierenden EPSPs gemessen. Die gemessenen Spitzenamplituden wurden dann auf den jeweils mittleren Ausgangswert der letzten fünf Minuten der Ausgangsphase normiert und gegen die Zeit aufgetragen.

Die Wildtyp-Mäuse zeigten in der Kontrollphase eine deutliche Reduktion der Größe der Antwortkurven auf zirka 70 Prozent der Spitzenamplituden der Ausgangsphase. Diese Reduktion war bis zum Ende der Messungen, 40 Minuten nach LTD-Induktion, stabil (Abbildung 4.7).

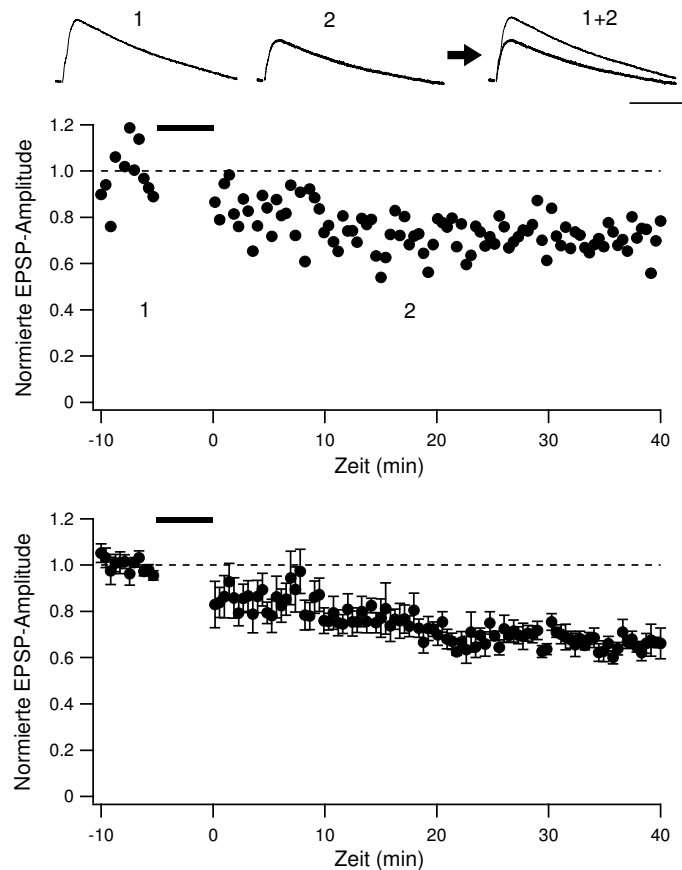


Abbildung 4.7: Langzeitdepression bei Wildtyp-Mäusen

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der LTD-Experimente an Wildtyp-Mäusen. Die Kurven zeigen beispielhaft für ein Experiment die gemittelten EPSPs von zwölf EPSPs zu den Zeitpunkten -7 min (Ausgangsphase, „1“ im oberen Graph) und 18 min (Kontrollphase, „2“ im oberen Graph). Der obere Graph zeigt für dieses Beispiexperiment die normierten Spitzenamplituden aufgetragen gegen die Zeit. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert von den Spitzenamplituden von fünf aufeinanderfolgenden EPSPs. Der untere Graph zeigt die Mittelwertkurve +/- S.E.M. aus allen LTD Messungen durchgeführt an Wildtyp-Mäusen (n=12). Jeder Datenpunkt ist auch ein zeitlicher Mittelwert für fünf aufeinanderfolgende EPSPs. Beide Graphen zeigen nach LTD-Induktion (schwarzer Balken) die Entwicklung einer stabilen LTD auf 70 Prozent des Ausgangswerts. Skalierungsbalken 50 ms, 2 mV. Stimulationsartefakte wurden entfernt.

Auch bei den heterozygoten R552H-Mäusen führte die LTD-Induktion zu einer 70-prozentigen stabilen Reduktion der Größe der Antwortkurven in der Kontrollphase (Abbildung 4.8).

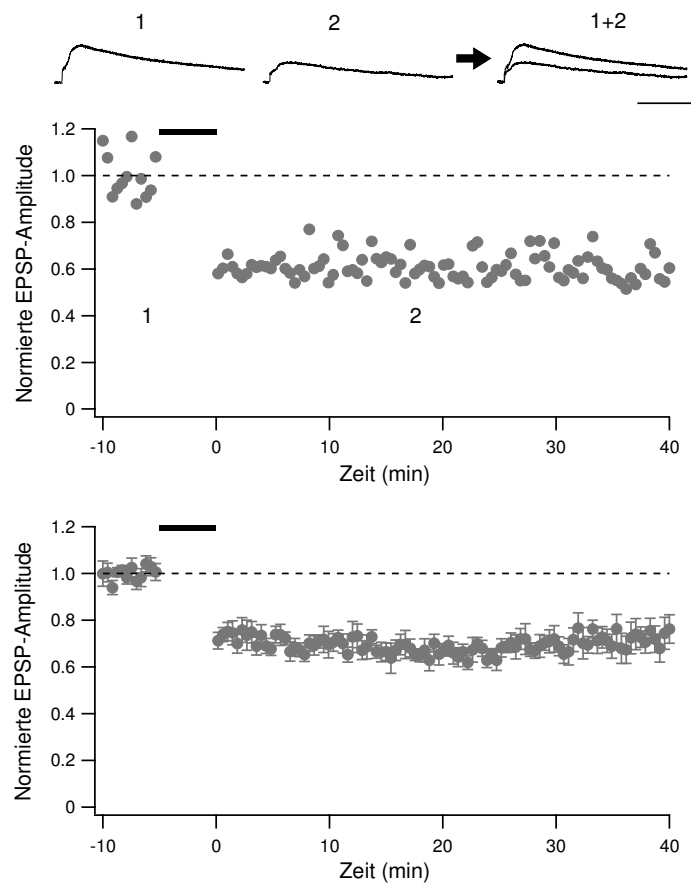


Abbildung 4.8: Langzeitdepression bei heterozygoten R552H-Mäusen

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der LTD-Experimente an heterozygoten R552H-Mäusen ($n=7$). Darstellung wie Abbildung 4.7.

Die Signifikanz dieser stabilen Reduktion wurde für jede Messung analysiert. Dazu wurde wie in der Literatur beschrieben (Hansel et al. 2006) der normierte Mittelwert der Spitzenamplitude der EPSPs der letzten fünf Minuten der Ausgangsphase mit dem Mittelwert der Spitzenamplitude der EPSPs der letzten zehn Minuten (31. bis 40. Minute) nach LTD-Induktion mittels eines t-Tests für verbundene Stichproben verglichen (Abbildung 4.9).

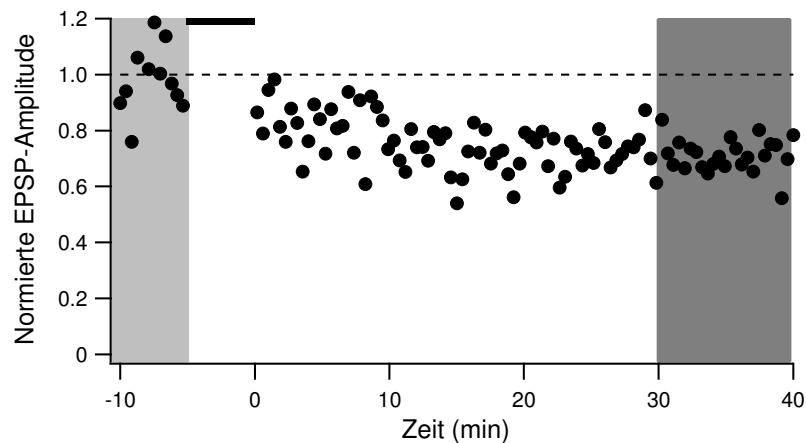


Abbildung 4.9: Verwendete Datenpunkte zur Analyse der Langzeitdepression

Der Graph entspricht dem in Abbildung 4.7 gezeigten LTD-Experiment einer Wildtyp-Maus. Jedes LTD-Experiment wurde auf die Signifikanz der LTD überprüft. Grau hinterlegt sind die Bereiche, dessen Datenpunkte für die statistische Auswertung verwendet wurden. Die letzten fünf Minuten der Ausgangsphase (hellgrau) und die letzten zehn Minuten der Kontrollphase (dunkelgrau) wurden jeweils mittels t-Test für verbundene Stichproben verglichen.

Diese Auswertung ergab bei den Wildtyp-Mäusen eine signifikante Reduktion der Werte der Kontrollphase im Vergleich zu den Werten der Ausgangsphase ($p < 0,001$, *degrees of freedom* (df)=11, $t=14,28$). Bei den heterozygoten R552H-Mäusen zeigte sich ebenfalls eine signifikante LTD ($p < 0,001$, $df=6$, $t=6,97$).

Somit konnte durch das LTD-Protokoll bei beiden Mausgruppen eine stabile LTD an der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse induziert werden.

Bei näherer Betrachtung der Kurvenverläufe zeigte sich allerdings ein anderer Zeitverlauf der LTD-Entwicklung bei den heterozygoten R552H-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 4.10). Wurden die mittleren Spitzenamplituden der EPSPs aller Messungen gegen die Zeit aufgetragen, so fiel auf, dass zwar die heterozygoten R552H-Mäuse wie die Wildtyp-Mäuse eine stabile LTD zeigten, jedoch schien sich die LTD bei den heterozygoten R552H-Mäusen schneller einzustellen. Bei den Wildtyp-Mäusen entwickelte sich die LTD, wie in der Literatur beschrieben innerhalb von 20 Minuten nach LTD-Induktion (Ito 2001). Hingegen zeigte sich bei den heterozygoten R552H-Mäusen bereits direkt im Anschluss an die Induktionsphase die Reduktion der EPSP-Amplituden auf zirka 70 Prozent ohne weitere Veränderung im Zeitverlauf.

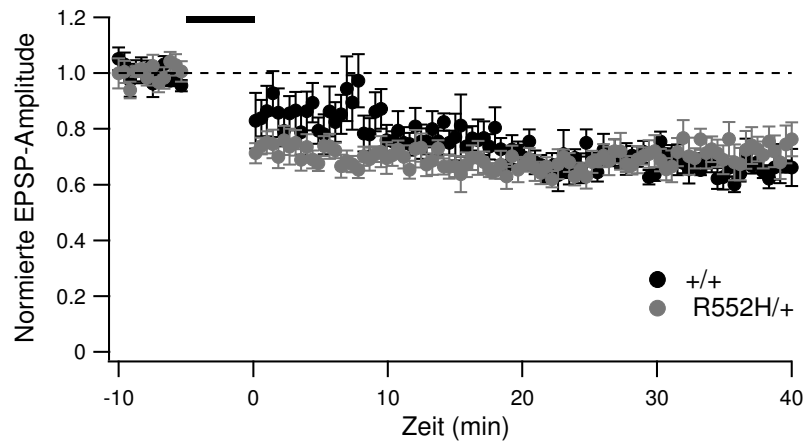


Abbildung 4.10: Vergleich der Langzeitdepression bei Wildtyp- und heterozygoten R552H-Mäusen

Diese Abbildung zeigt die beiden Mittelwertkurven \pm S.E.M. aus allen LTD Messungen der Wildtyp- (+/+) und heterozygoten R552H-Mäuse (R552H/+). Die Kurven entsprechen dabei den jeweils unteren Graphen der Abbildungen Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8. Beide Kurven zeigen nach Induktion des LTD-Protokolls (schwarzer Balken) die Entwicklung einer stabilen LTD auf 70 Prozent des Ausgangswerts. Jedoch sieht man Unterschiede im Zeitverlauf beider Kurven. Bei den Wildtyp-Mäusen entwickelt sich die LTD graduell innerhalb von 20 Minuten nach LTD-Induktion. Bei den heterozygoten R552H-Mäusen ist die LTD bereits im Anschluss an die Induktion sichtbar.

Um diesen Zeitverlauf auf signifikante Unterschiede zu analysieren, wurden die Werte der ersten zehn Minuten nach LTD-Induktion (erste bis zehnte Minute) mit den Werten der nachfolgenden zehn Minuten (11. bis 20. Minute) mittels eines t-Tests für verbundene Stichproben verglichen (Abbildung 4.11).

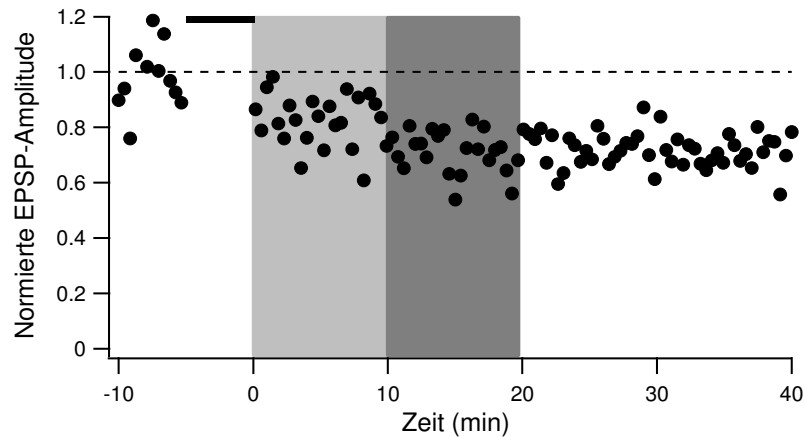


Abbildung 4.11: Verwendete Datenpunkte zur Analyse der Langzeitdepressionsentstehung

Der Graph entspricht dem in Abbildung 4.7 gezeigten LTD-Experiment einer Wildtyp-Maus. Jedes LTD-Experiment wurde auf die zeitliche Entstehung der LTD überprüft. Grau hinterlegt sind die Bereiche, dessen Datenpunkte für die statistische Auswertung verwendet wurden. Die ersten zehn Minuten der Kontrollphase (hellgrau) und die zweiten zehn Minuten der Kontrollphase (dunkelgrau) wurden jeweils mittels t-Test für verbundene Stichproben verglichen.

Die statistische Auswertung bestätigte für die Wildtyp-Mäuse das graduelle Entstehen der LTD mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Spitzenamplitudengrößen der EPSPs der ersten zehn Minuten nach LTD-Induktion und der nachfolgenden zehn Minuten ($p < 0,025$, $df = 11$, $t = 2,63$ bis $2,87$).

Die bei den heterozygoten R552H-Mäusen bereits in den ersten zehn Minuten nach LTD-Induktion auftretende Depression der EPSPs zeigte keine weitere signifikante Verringerung der EPSPs in den nachfolgenden zehn Minuten ($p > 0,16$, $df = 6$, $t = -0,29$ bis $1,28$).

So konnte zwar bei beiden Mausgruppen mit dem LTD-Protokoll eine stabile LTD induziert werden. Dennoch zeigten sich Unterschiede in der zeitlichen Entwicklung dieser LTD zwischen den Gruppen. Bei den heterozygoten R552H-Mäusen stellte sich die Verringerung der Antwortamplituden signifikant schneller ein als bei den Wildtyp-Mäusen.

4.2.2 Paarpulsbahnung an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse

Die Paarpulsbahnung ist eine Form der Kurzzeitplastizität, die typisch ist für Parallelfaser-Purkinjezell-Synapsen (Abbildung 4.12). Ein kurz auf den ersten Stimulus

der Parallelfasern folgender zweiter Stimulus führt in der Purkinjezelle zu einer Bahnung der zweiten Antwort. Diese Bahnung ist dabei frequenzabhängig (Konnerth et al. 1990; Atluri und Regehr 1996). Als mögliche Ursachen für diese Bahnung werden residuales Calcium (Zucker und Regehr 2002) und extrazelluläres Kalium (Malenka et al. 1981) diskutiert. Protokolle zur Induktion von Paarpulsbahnung werden oft angewandt, da sie auf präsynaptische Änderungen in der Neurotransmitterfreisetzung hinweisen können (Atluri und Regehr 1996).

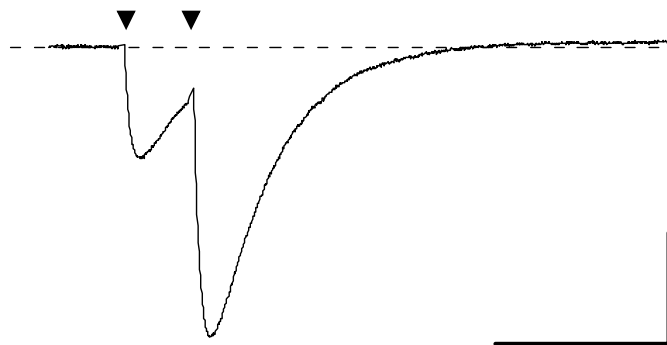


Abbildung 4.12: Paarpulsbahnung an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse

Die Abbildung zeigt die Antwortkurve einer Purkinjezelle nach extrazellulärer Paarpulsstimulation (▼) von Parallelfasern. Das Interstimulusintervall beträgt 20 ms. Auf den zweiten Stimulus folgt eine deutlich größere Antwort als auf den ersten Stimulus. Diese Bahnung ist charakteristisch für Parallelfaser-Purkinjezell-Synapsen. Skalierungsbalken 50 ms, 100 %. Stimulationsartefakte wurden entfernt.

Die Experimente zur Paarpulsbahnung wurden an 16 heterozygoten R552H-Mäusen und 15 Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Zur Messung der Paarpulsbahnung wurde eine Stimulationspipette zirka 60 µm vom Purkinjezell-Körper entfernt in der Körnerzellschicht platziert, um die Parallelfasern mit Paarpulsen zu stimulieren. Die Experimente wurden im *voltage-clamp* Modus durchgeführt. Je gemessener Purkinjezelle wurden für folgende Interstimulusintervalle jeweils fünf EPSCs aufgenommen: 10 ms, 20 ms, 40 ms, 50 ms, 75 ms, 100 ms, 150 ms und 200 ms. Bei Betrachtung der einzelnen Kurven zeigten die Wildtyp- und die heterozygoten R552H-Mäuse die charakteristische Bahnung, jedoch schien diese für kurze Interstimulusintervalle bei heterozygoten R552H-Mäusen stärker zu sein als bei den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 4.13).

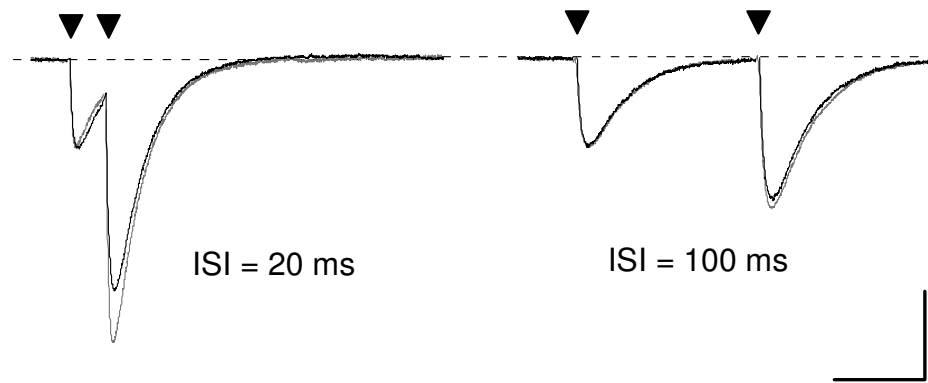


Abbildung 4.13: Paarpulsbahnung bei Wildtyp- und heterozygoten R552H-Mäusen

Die Abbildung zeigt beispielhaft die Paarpulsbahnung bei Wildtyp- (schwarz) und bei heterozygoten R552H-Mäusen (grau). Die Antwortkurven zeigen einzelne Messungen für zwei Interstimulusintervalle (ISI). Die Antwort des ersten Stimulus (▼) wurde jeweils auf 100 % normiert. Bei einem ISI von 20 ms ist die Antwort der heterozygoten R552H-Maus auf den zweiten Stimulus größer als bei der Wildtyp-Maus. Bei einem ISI von 100 ms besteht kein Unterschied zwischen den beiden Kurven. Skalierungsbalken 50 ms, 100 %. Stimulationsartefakte wurden entfernt.

Um diesen Unterschied zu quantifizieren, wurde für jede Purkinjezelle aus den fünf gemessenen EPSCs je Interstimulusintervall eine gemittelte Kurve gebildet. Aus dieser Kurve wurde dann das Paarpulsverhältnis für jedes Interstimulusintervall bei jeder Zelle ermittelt. Das Paarpulsverhältnis ergibt sich dabei aus dem Verhältnis der zweiten zur ersten Spitzenamplitude.

Die Paarpulsverhältnisse ergaben für jedes Interstimulusintervall bei den heterozygoten R552H-Mäusen sowie bei den Wildtyp-Mäusen Werte größer als eins und somit eine Paarpulsbahnung. Für kurze Interstimulusintervalle war die zweite Antwort bis zu 3,5-mal größer als die erste Antwort. Für längere Intervalle war die zweite Antwort im Bereich von 1,2- bis 1,5-mal größer. Dabei waren die Werte der Paarpulsverhältnisse bei heterozygoten Mäusen größer als die bei den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 4.14).

Die Werte wurden für jedes Interstimulusintervall auf signifikante Unterschiede zwischen den heterozygoten R552H-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen mittels ANOVA überprüft. Für kurze Interstimulusintervalle (10-75 ms) war die Paarpulsbahnung bei den heterozygoten R552H-Mäusen signifikant stärker ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Für längere Interstimulusintervalle (100-200 ms) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

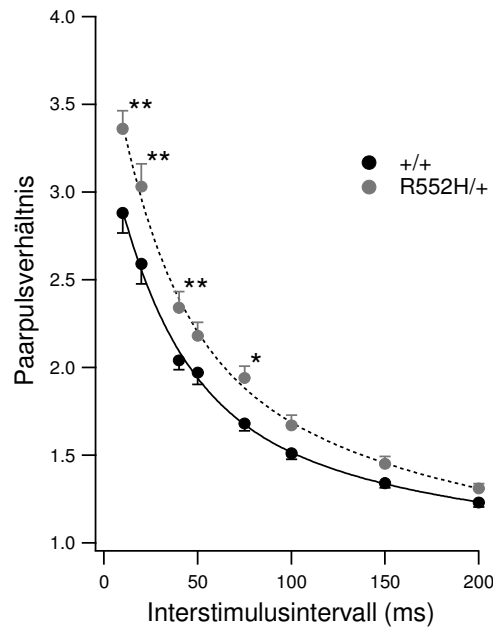


Abbildung 4.14: Paarpulsverhältnis bei Wildtyp- und heterozygoten R552H-Mäusen

Die Abbildung zeigt das Paarpulsverhältnis für jedes gemessene Interstimulusintervall bei Wildtyp- (+/+, n=15) und heterozygoten R552H-Mäusen (R552H/+, n=16). Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert +/- S.E.M. aller Paarpulsverhältnisse für das jeweilige Interstimulusintervall. Bei kurzen Interstimulusintervallen (10-75 ms) ist die Antwort bei den heterozygoten R552H-Mäusen signifikant stärker als bei den Wildtyp-Mäusen (analysiert mittels ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Die durchgezogene und die gestrichelte Linie zeigen jeweils eine doppel-exponentielle Abfallkurve durch die Daten.

Die heterozygoten R552H-Mäuse zeigten somit eine signifikant verstärkte Paarpulsbahnung an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse für kurze Interstimulusintervalle.

Zusammengenommen mit den oben beschriebenen Veränderungen im Zeitverlauf der LTD-Entstehung zeigen sich bei heterozygoten R552H-Mäusen demzufolge Unterschiede zu den Wildtyp-Mäusen bei beiden untersuchten Plastizitätsformen an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse.

5 Diskussion

Durch Generierung einer R552H-Maus konnten erstmals Untersuchungen an einem Modell durchgeführt werden, welches die Punktmutation der KE-Familie trägt. Die hier vorgestellten Daten zur Elektrophysiologie des Kleinhirns bei heterozygoten R552H-Mäusen sind Teil der 2008 erschienenen Arbeit „Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech“ (Groszer et al. 2008), welche den Einfluss dieser Punktmutation auf das Modellsystem untersucht.

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten elektrophysiologischen Messungen am Kleinhirn konnten synaptische Veränderungen an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse im Kleinhirn bei heterozygoten R552H-Mäusen beschrieben werden. Messungen zur Langzeitdepression (LTD) ergaben einen signifikant unterschiedlichen Zeitverlauf der LTD-Entwicklung. Die Paarpulsbahnung an dieser Synapse war signifikant verstärkt für kurze Interstimulusintervalle (10-75 ms).

Kollaborationspartner der Veröffentlichung führten Untersuchungen zur Morphologie, zum Gewicht, zur Ultraschallvokalisation, zum Erlernen motorischer Abläufe und zur zellulären Plastizität im Striatum an R552H-Mäusen durch. Morphologische Untersuchungen an R552H-Mäusen zeigten bei homozygoten Mäusen ein kleineres Kleinhirn. Bei den heterozygoten R552H-Mäusen fanden sich keine morphologischen Auffälligkeiten im Gehirn. Homozygote Mäuse hatten eine geringere postnatale Gewichtszunahme und die Ultraschallvokalisation war verändert. Alle Mäuse zeigten normales motorisches Verhalten. Untersuchungen an heterozygoten R552H-Mäusen ergaben jedoch signifikante Defizite, wenn sie spezifische motorische Abläufe erlernen sollten. Elektrophysiologische Messungen im dorsolateralen Striatum zeigten ebenfalls Veränderungen der synaptischen Plastizität. Hier konnte kein LTD induziert werden (Groszer et al. 2008).

5.1 KE-Familie

Die in dieser Arbeit und bei Groszer et al. 2008 verwendete R552H-Maus dient als Modell der KE-Familie. Die KE-Familie ist das am ausführlichsten untersuchte Beispiel für eine angeborene spezifische Sprachstörung. Die Hälfte dieser 1990 entdeck-

ten englischen Großfamilie zeigt Störungen beim Sprechen, beim Sprachverständnis und beim Schreiben. Als genetisches Korrelat für diese Störung wurde eine Punktmutation im FoxP2-Gen gefunden (Lai et al. 2003).

Die Charakterisierung der Sprachstörung der KE-Familie bietet die bisher einzigartige Möglichkeit, Mechanismen zu identifizieren, die bei dieser Sprachstörung verändert sind und somit essentiell für eine intakte Sprachentwicklung beim Menschen sein könnten. Seit mehreren Jahrzehnten wird daher der Einfluss des FoxP2-Gens als „Sprachgen“ auf die Sprachstörung der KE-Familie intensiv erforscht. Bisherige Arbeiten setzten den Fokus entweder auf klinische und apparative Untersuchungen der KE-Familie (Fletcher 1990; Vargha-Kadem 1990; Vargha-Khadem et al. 1998; Watkins et al. 2002b; Watkins et al. 2002a; Belton et al. 2003) oder auf Genetik, Expression, Morphologie und Verhalten am Modellsystem Maus (Fisher et al. 1998; Lai et al. 2001; Enard et al. 2002; Lai et al. 2003; Ferland et al. 2003; MacDermot et al. 2005; Shu et al. 2005; Shu et al. 2007). Bisher fehlte jedoch die Betrachtung der zellulären Ebene als Bindeglied zwischen Molekular- und Verhaltensbiologie. Auch fehlte bisher ein Modellsystem, an dem die spezifischen Auswirkungen der Punktmutation der KE-Familie untersucht werden könnten. Als Modellsystem der Sprachstörung dienten bisher FoxP2-Knockout-Mäuse, bei denen komplette Exons ausgeschaltet waren, was dann zu einem erheblichen Funktionsverlust des Genes führte (Shu et al. 2005). Die Generierung der R552H-Knockin-Mäuse erlaubte erstmals, den Einfluss der Punktmutation der KE-Familie auf zellulärer Ebene in einem Modellsystem zu untersuchen.

Die Verwendung eines Mausmodells hat gewisse Vor- und Nachteile. Werden Mäuse als Modell für Untersuchungen einer menschlichen Komponente eingesetzt, muss man berücksichtigen, dass genetisch veränderte Mäuse nicht automatisch dem Menschen ähnliche oder gar identische Defizite zeigen. Besonders bei so spezifischen Genomveränderungen wie der R552H-Punktmutation ist es möglich, dass die Mutation zu spezifischen Veränderungen führt, die sich nicht an einem Mausmodell untersuchen lassen. Ein Hinweis auf diese Schwäche könnte sein, dass die heterozygoten R552H-Mäuse trotz der synaptischen Veränderungen keine morphologischen Unterschiede aufweisen (Groszer et al. 2008), bei den heterozygoten KE-Familienmitgliedern jedoch Auffälligkeiten in der Morphologie des Kleinhirns ent-

deckt wurden (Watkins et al. 2002; Belton et al. 2003). Es ist weiterhin möglich, dass das veränderte Genprodukt in einem Maussystem gar nicht funktionieren kann. Im konkreten Fall soll eine Sprachstörung in einem Modell charakterisiert werden, welches nicht zur Sprachproduktion fähig ist. Für eine normale Funktion des Genprodukts spricht in diesem Falle allerdings, dass sich die heterozygoten FoxP2-Mäuse regulär entwickeln (Groszer et al. 2008) und keine Veränderungen zeigen wie die Knockout-Mäuse, bei denen eine normale Genfunktion bewusst verhindert wurde (Shu et al. 2005). Auch können Veränderungen in der Vokalisation der Mäuse nachgewiesen werden (Groszer et al. 2008), die im Sinne einer Sprachstörung interpretiert werden könnten.

Für die Verwendung eines Mausmodells zur Untersuchung der Sprachstörung der KE-Familie sprechen weitere Gründe: 1) Die Maus ist ein Säugetier, an dem genetische Manipulationen zur Modellierung menschlicher Krankheiten etabliert sind und vermessen werden können. 2) Die in dieser Arbeit und bei Groszer et al. 2008 dargestellten Untersuchungen auf zellulärer Ebene sind bisher nur an diesem Modellsystem möglich. 3) Mutationen menschlicher Erkrankungen sind bereits mehrfach erfolgreich im Mausmodell untersucht worden (Cox und Brown 2003). Die Ergebnisse der Untersuchungen an dem R552H-Mausmodell können also trotz gewisser Einschränkungen auf die KE-Familie übertragen werden.

Um die Bedingungen der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente möglichst eng an dem genetischen Zustand der menschlichen KE-Familie zu orientieren, wurden die in dieser Arbeit vorgestellten elektrophysiologischen Messungen an heterozygoten R552H-Mäusen durchgeführt. Die betroffenen Familienmitglieder der KE-Familie sind heterozygot für diese Punktmutation im FoxP2-Gen. Es scheint sich um eine äußerst seltene Spontanmutation zu handeln, die heterozygot aufgetreten ist und somit auch nur zu heterozygoten oder gesunden Nachkommen führt. Es wurde bisher kein Mensch beschrieben, der eine homozygote KE-Mutation trägt. Heterozygote R552H-Mäuse sind also ein geeignetes Modell für die Sprachstörung der KE-Familie.

5.2 Beteiligte Schaltkreise bei Veränderungen der KE-Familie

Die KE-Familie zeigt kernspintomographische Auffälligkeiten in unterschiedlichen Hirnregionen (Vargha-Khadem et al. 1998; Watkins et al. 2002b; Belton et al. 2003). Ebenso wird das FoxP2-Gen an vielen Stellen im Gehirn exprimiert (Lai et al. 2001; Ferland et al. 2003). Dennoch gab es entscheidende Hinweise für einen Einfluss vom FoxP2-Gen auf das Kleinhirn: Die in Shu et al. 2005 generierten FoxP2-Knockout-Mäuse zeigten starke morphologische Veränderungen im Kleinhirn. Auch morphologische Untersuchungen an den R552H-Mäusen ergaben Auffälligkeiten, die durch die spezifischere Genomveränderung allerdings subtiler und daher nur am homozygoten Kleinhirn sichtbar waren.

In dieser Arbeit wurde mittels elektrophysiologischer Messungen der Einfluss der R552H-Mutation im FoxP2-Gen auf das Kleinhirn überprüft. Die Messungen wurden am erregenden Schaltkreis des Kleinhirnkortex durchgeführt. Dieser scheint besonders anfällig für Veränderungen im Genom zu sein: Viele Mausmutanten zeigen multiple Kletterfaser-Purkinjenzell-Innervationen (Kano et al. 1997; Kano et al. 1998; Ichikawa et al. 2002; Hashimoto und Kano 2005) und Veränderungen der Plastizität der erregenden Eingänge auf die Purkinjenzelle (Aiba et al. 1994; Miyata et al. 2001; Matsukawa et al. 2003; Steinberg et al. 2006). Die starke Expression von FoxP2 in der Purkinjenzelle (Ferland et al. 2003) spricht ebenfalls für Veränderungen an diesem Schaltkreis. Die Hypothese war folglich, dass die R552H-Mutation im FoxP2-Gen zu Veränderungen der Kletterfaser-Purkinjenzell-Verschaltung und der Plastizität der Purkinjenzell-Eingänge führt.

Interessanterweise konnten die in dieser Arbeit vorgestellten elektrophysiologischen Untersuchungen der Kletterfaser-Purkinjenzell-Synapsen die Hypothese nicht bestätigen. Es zeigte sich eine mit dem Wildtyp vergleichbare intakte Kletterfaser-Purkinjenzell-Verschaltung. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass bei dem verwendeten Mausmodell kein ganzes Gen ausgeschaltet wurde, sondern ausschließlich eine einzelne Base im Genom ausgetauscht wurde. Diese Mutation ist also eventuell so spezifisch, dass sie im Kleinhirn die Entwicklung der Kletterfaser nicht beeinflusst oder mögliche Änderungen durch die angewandte elektrophysiologische Methode nicht erfasst werden konnten.

Signifikante Veränderungen konnten allerdings für beide untersuchte Plastizitätsformen, die Langzeitdepression und die Paarpulsbahnung, an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse gefunden werden. Die LTD entwickelte sich signifikant schneller als bei Wildtyp-Mäusen, die Paarpulsbahnung an dieser Synapse war für kurze Interstimulusintervalle (10-75 ms) signifikant verstärkt. Diese Veränderungen zeigten sich dabei an einer Stelle im Gehirn, die eine etablierte Rolle im Zusammenhang mit dem Erwerb motorischer und feinmotorischer Fähigkeiten spielt (Lieberman 2002). Das Kleinhirn ist beispielsweise für die Artikulation von Sprache notwendig. So weisen Patienten mit einer Läsion im Kleinhirn eine Dysarthrie auf (Ackermann et al. 1992). Bestimmte Bereiche des Kleinhirns sind außerdem bei der Wortgenerierung aktiv. Und so schreibt man dem Kleinhirn neben motorischen Funktionen mittlerweile eine Rolle bei der Sprachgenerierung und -verarbeitung (Fiez und Raichle 1997; Lieberman 2002) und anderen kognitiven Funktionen wie Lernen und Gedächtnisformierung zu (Timmann und Daum 2007; Lieberman 2002). Die in der Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen also in einem System, das eine Sprachstörung modelliert, Veränderungen der Plastizität in einem Hirnbereich, der mit der Generierung von Motorik und Sprache in Verbindung gebracht wird.

Außerdem wurden bei der KE-Familie morphologische Veränderungen im Striatum und bei den heterozygoten R552H-Mäusen Veränderungen der synaptischen Plastizität im Striatum entdeckt (Groszer et al. 2008), welches zusätzlich zu motorischen Funktionen ebenfalls eine Rolle bei der Sprachgenerierung und -verarbeitung spielen soll (Lieberman 2002). Bezüglich der Langzeitplastizität waren die Unterschiede zum Wildtyp sogar deutlich stärker als im Kleinhirn: Während im Kleinhirn lediglich der Zeitverlauf verändert war, konnte im dorsolateralen Striatum an glutamatergen Synapsen kein LTD induziert werden. Das Striatum scheint also eine mindestens ebenso wichtige Rolle für die Sprachstörung der KE-Mutation zu spielen.

Den beobachteten motorischen Störungen der heterozygoten R552H-Mäuse (Groszer et al. 2008) sowie der Sprachstörung der KE-Familie könnten also Störungen der synaptischen Plastizität an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse im Kleinhirn und an glutamatergen Synapsen im dorsolateralen Striatum zugrunde liegen, die durch Veränderungen im FoxP2-Gen hervorgerufen werden.

Dies unterstützt die bestehende These, dass die Fähigkeit des Menschen zu sprechen aus sehr alten neuronalen Schaltkreisen hervorgeht, die eine bedeutende Rolle beim Erlernen von Motorik spielen (Lieberman 2002).

5.3 Beteiligte Schaltkreise beim Spracherwerb

Das FoxP2-Gen ist eines der höchst konservierten Gene, die man beim Vergleich von Mensch und Nagetier bisher gefunden hat (Enard et al. 2002). Es wird angenommen, dass die evolutionären Veränderungen im menschlichen FoxP2-Gen die feinmotorischen Abläufe der Mund- und Kehlkopfmuskeln beeinflusst und einen Anteil daran hat, dass der Mensch Sprache produzieren kann (Vargha-Khadem et al. 2005).

Diese feinmotorischen Abläufe sind bei Mitgliedern der KE-Familie, die eine Punktmutation im FoxP2-Gen tragen, im Sinne einer verbalen Dyspraxie gestört. Wie oben bereits diskutiert ist ein Zusammenhang der Plastizitätsveränderungen im Kleinhirn und Striatum bei verändertem FoxP2-Gen mit Störungen feinmotorischer Abläufe möglich. Eine Funktion vom FoxP2-Gen im Menschen könnte daher sein, die schnellen Bewegungen im Mundbereich über striatale und cerebelläre Schaltkreise zu beeinflussen. Es stellt sich also die Frage, welchen Einfluss die menschliche Version des FoxP2-Gens auf diese Schaltkreise hat.

Nachdem die Punktmutation der KE-Familie in einem Mausmodell untersucht wurde, erschienen 2009 und 2011 Arbeiten zu Untersuchungen an Mäusen, die homozygot für die normale menschliche Version des FoxP2-Gen waren (Enard et al. 2009, Reimers-Kipping et al. 2011).

Die so genannten humanisierten FoxP2-Mäuse zeigten eine veränderte Vokalisation der Jungtiere, weniger Erkundungsverhalten, weniger Dopamin in bestimmten Hirnregionen sowie längere Dendriten im Striatum. Elektrophysiologische Messungen an den glutamatergen Synapsen im dorsolateralen Striatum ergaben eine signifikant verstärkte LTD im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen (Enard et al. 2009).

Ein humanisiertes Protein, welches mit dem menschlichen Spracherwerb in Verbindung gebracht wird, führt im Striatum somit zu einer entgegengesetzten Verände-

rung im LTD als die KE-Mutation, die Ursache einer Sprachstörung ist. Plastizitätsveränderungen im Striatum scheinen also nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Sprachstörung der KE-Familie, sondern auch beim Spracherwerb zu spielen.

Im Falle des Kleinhirns ist die Rolle bezüglich des Spracherwerbs nicht so eindeutig: LTD- und Paarpulsbahnungs-Messungen an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse führten zu keinen Veränderungen der Plastizität bei den humanisierten FoxP2-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen (Reimers-Kipping et al. 2011). Nicht jede Mutation im FoxP2-Gen (Humanisierung bzw. R552H) führt also zu Plastizitätsveränderungen am erregenden Schaltkreis des Kleinhirnkortex. Reimers-Kipping et al. (2011) vermuten, dass das FoxP2-Gen im Kleinhirn zwar eine Rolle bei der spezifischen Sprachstörung der KE-Familie spielt, die dem Kleinhirn zugeschriebenen Funktionen beim Sprechen (Ackermann 2008) jedoch nicht auf den evolutionären Änderungen des FoxP2-Gen basieren, welche die humanisierten FoxP2-Mäuse modellieren (Reimers-Kipping et al. 2011).

Diese Vermutung steht jedoch im Widerspruch mit einer Studie über die unterschiedlichen Genkaskaden bei Schimpanse und Mensch (Konopka et al. 2009). Beim Vergleich aller Gene, deren Expression von FoxP2 bei diesen beiden Arten reguliert wird, konnten 116 Gene identifiziert werden, deren Expression sich beim Menschen deutlich von der Expression beim Schimpansen unterscheidet. Interessanterweise sind diese 116 Gene nicht nur in die neonatale Ausbildung von Bindegewebe, Gesichts- und Schädelknochen involviert, sondern auch in motorische Funktionen des Kleinhirns (Konopka et al. 2009). Dies spricht dafür, dass die evolutionären Änderungen der humanisierten FoxP2-Version einen Einfluss auf das Kleinhirn nehmen – auch wenn dies auf zellulärer Ebene durch Messungen der Plastizität des erregenden Schaltkreises im Kleinhirnkortex nicht nachweisbar ist. Weiterhin untermauern diese Ergebnisse die These, dass das Kleinhirn eine wichtige Rolle bei der Evolution von Sprache gespielt hat (Lieberman 2002).

Die scheinbare Diskrepanz der oben diskutierten Ergebnisse könnte am ehesten darauf beruhen, dass die Funktion des FoxP2-Gens bisher nicht hinreichend verstanden ist. Eventuell führt die humanisierte FoxP2-Variante zu anderen Veränderungen des Kleinhirnkortex, die in bisherigen Untersuchungen nicht herausgearbeitet werden konnten. Oder diese Mutation führt zu so spezifischen Veränderungen, dass

diese im Kleinhirnkortex auf zellulärer Ebene nicht messbar sind oder in einem Mausmodell nicht sichtbar werden können. Immerhin liegen die Unterschiede zwischen dem FoxP2-Gen der Maus und des Menschen nicht wie bei der R552H-Mutation innerhalb der Forkhead-Domäne und somit auch nicht an einer Schlüsselstelle für die FoxP2-Funktion (siehe Abbildung 1.4). Dies spricht für subtilere Veränderungen im Kleinhirn der humanisierten FoxP2-Mutante als im Kleinhirn der R552H-Mutante.

Zusammengenommen kann man davon ausgehen, dass die evolutionären Veränderungen im FoxP2-Gen, welche mit dem Spracherwerb beim Menschen in Verbindung gebracht werden, Einfluss auf striatale und cerebelläre Schaltkreise nehmen. Diese Schaltkreise scheinen also nicht nur bei der Sprachstörung der KE-Familie eine Rolle zu spielen, sondern eben auch bei der Sprachentwicklung des Menschen.

5.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat zu einem tieferen Verständnis möglicher Mechanismen der spezifischen Sprachstörung der KE-Familie beigetragen. Gleichwohl sind die Funktion des FoxP2-Gens und sein Einfluss auf diese Sprachstörung nicht endgültig verstanden. Zum weiteren Verständnis der FoxP2-Funktion erscheinen die im Folgenden dargestellten Ansätze erfolgversprechend.

5.4.1 Weitere Charakterisierung der KE-Mutation

Die vorliegende Arbeit zeigt Veränderungen der synaptischen Plastizität am erregenden Schaltkreis im Kleinhirnkortex bei heterozygoten R552H-Mäusen. Auch ist bei diesen Mäusen die Plastizität im Striatum verändert (Groszer et al. 2008). Da Plastizität eine generelle Eigenschaft von Synapsen ist, kann man davon ausgehen, dass der Einfluss von FoxP2 auf synaptische Plastizität nicht auf diese zwei Bereiche beschränkt ist. Durch Messungen an weiteren (z. B. inhibitorischen) Schaltkreisen des Kleinhirnkortex und in anderen Hirnregionen könnten weitere Bereiche identifiziert werden, deren Plastizität durch die R552H-Mutation im FoxP2-Gen verändert ist.

Um molekulare Mechanismen beschreiben zu können, auf denen die Veränderung der Paarpulsbahnung an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse basiert, ist eine quan-

tale Analyse dieser Synapse bei heterozygoten R552H-Mäusen denkbar (Hallermann et al. 2010).

5.4.2 Konditionales Mausmodell

An dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiermodell konnte untersucht werden, welche Veränderungen das R552H-FoxP2-Gen am Modell hervorruft. Es ist allerdings nicht möglich zu unterscheiden, ob die Veränderungen auf Störungen in der Entwicklung oder auf Störungen des ausgereiften Systems zurückzuführen sind. Im Falle der synaptischen Plastizität kann beispielsweise nicht differenziert werden, ob das Gen bei der Ausbildung der Synapse eine Rolle spielt oder ob einzelne Genprodukte direkt an der synaptischen Transmission beteiligt sind. Um nun aber die FoxP2-Funktion weiter aufzuschlüsseln, wäre es hilfreich unterscheiden zu können, welchen Einfluss FoxP2 auf die Kleinhirnentwicklung und welchen Einfluss auf das ausgereifte Kleinhirn oder andere Netzwerke nimmt.

Ein möglicher Ansatz wäre eine Versuchsreihe zur synaptischen Plastizität an Mäusen, bei denen die Expression von FoxP2 in bestimmten Hirnregionen zu bestimmten Zeitpunkten an- oder ausgeschaltet werden kann, sogenannte konditionale Knockout- bzw. Knockin-Mäuse (Kwan 2002; Bayascas 2006; Skvorak et al. 2006; French et al. 2007). Diese Methodik ist besonders hilfreich, um ein vollständiges Bild von einem Gen zu bilden, bei dem das Gen Einfluss auf verschiedene Gewebe nimmt und es daher bei einem Knockout- oder Knockin-Tier nicht möglich ist, seinen Einfluss auf einen bestimmten Zelltyp oder eine bestimmte Entwicklungsstufe herauszufiltern (Kwan 2002). Diese Methodik wäre also für das FoxP2-Gen gut geeignet, da es eine pleiotrope Wirkung auf verschiedene Zellen und zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung ausübt.

Mittels eines konditionalen FoxP2-Mausmodells könnte man den Einfluss des FoxP2-Gens auf bestimmte neuronale Schaltkreise zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten separat untersuchen. In diesem Zusammenhang wären Untersuchungen an Kleinhirn und Striatum beim konditionalen humanisierten R552H-FoxP2-Modell denkbar. Diese FoxP2-Version entspräche dann exakt dem FoxP2-Gen der KE-Familie und man könnte sich ein detailliertes Bild der FoxP2-Funktion hinsichtlich der Sprachstörung der KE-Familie und dem Spracherwerb verschaffen.

Das weitere Verständnis der einzigartigen Sprachstörung der KE-Familie und der gesamten FoxP2-Funktion wäre dann ein wichtiger Schritt bei der Charakterisierung des genetischen Netzwerks, welches den menschlichen Sprachprozessen zugrunde liegt. Die Entschlüsselung dieses Netzwerks wird entscheidende Auswirkungen auf das Verständnis von Spracherwerb und Sprachstörungen haben.

6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Synaptische Plastizität im Kleinhirnkortex von FoxP2-mutanten Mäusen*

eingereicht von Muriel Georgette Stoppe, geb. Baum

angefertigt am Institut für Physiologie, Abt. Neurophysiologie, der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

betreut von Prof. Dr. med. Jens Eilers

eingereicht im Februar 2011

Die KE-Familie ist das am ausführlichsten untersuchte Beispiel für eine angeborene spezifische Sprachstörung. Die Hälfte dieser 1990 entdeckten englischen Großfamilie zeigt Defizite beim Erlernen und Durchführen komplexer orofazialer Bewegungsabläufe sowie Störungen beim Sprachverständnis und beim Schreiben. Es handelt sich dabei um eine monogene Erbkrankheit: Die betroffenen Familienmitglieder der KE-Familie sind heterozygot für eine Punktmutation im FoxP2-Gen (Lai et al. 2001). Es ist Gegenstand intensiver Forschung, durch Untersuchungen dieser Sprachstörung Hinweise auf Mechanismen zu finden, die dem Spracherwerb beim Menschen zu Grunde liegen. Kernspintomographische Untersuchungen an der KE-Familie ergaben Auffälligkeiten in verschiedenen Hirnregionen, unter anderem im Kleinhirn (Vargha-Khadem et al. 1998; Watkins et al. 2002; Belton et al. 2003). Morphologische Untersuchungen an FoxP2-Knockout-Mäusen zeigten ebenfalls Auffälligkeiten im Kleinhirn (Shu et al. 2005). Genauere Kenntnisse über den Einfluss vom FoxP2-Gen auf das Kleinhirn könnten daher helfen, die Rolle des FoxP2-Gens bezüglich dieser Sprachstörung, aber auch hinsichtlich der Sprachfähigkeit des Menschen weiter aufzuschlüsseln.

* Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden vorab veröffentlicht in Groszer M, Keays DA, Deacon RM, de Bono JP, Prasad-Mulcare S, Gaub S, **Baum MG**, French CA, Nicod J, Coventry JA, Enard W, Fray M, Brown SD, Nolan PM, Pääbo S, Channon KM, Costa RM, Eilers J, Ehret G, Rawlins JN, Fisher SE, Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits, Curr Biol. 2008 Mar 11;18:354-62.

Die Experimente, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen, erforschten erstmals den Einfluss der KE-Mutation im FoxP2-Gen auf zellulärer Ebene und stellen damit ein Bindeglied zwischen den bisherigen molekular- und verhaltensbiologischen Arbeiten zu dieser spezifischen Sprachstörung dar. Die elektrophysiologischen Messungen am Kleinhirn wurden an dem erstmals von der Arbeitsgruppe von Simon E. Fisher in Oxford generiertem R552H-Mausmodell durchgeführt, das die KE-Punktmutation im FoxP2-Gen trägt und sind Teil der 2008 erschienenen Arbeit „Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech“ von Groszer et al., welche den Einfluss dieser Punktmutation auf das Modellsystem untersucht hat.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Messungen wurden am in der Literatur ausführlich beschriebenen erregenden Schaltkreis des Kleinhirnkortex durchgeführt. Dieser Schaltkreis scheint besonders anfällig für Veränderungen durch die R552H-Mutation zu sein: Zum einen sind in vielen Mausmutanten die einfache Kletterfaser-Purkinjenzell-Innervation (Kano et al. 1997; Kano et al. 1998; Ichikawa et al. 2002; Hashimoto und Kano 2005) und die Fähigkeit zur Plastizität gestört (Aiba et al. 1994; Miyata et al. 2001; Matsukawa et al. 2003; Steinberg et al. 2006). Zum anderen wird das FoxP2-Gen im Kleinhirn vor allem in den Purkinjenzellen exprimiert (Ferland et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob bei heterozygoten R552H-Mäusen die Kletterfaser- und Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse regelgerecht verschaltet sind. Weiterhin wurde die Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse anhand zweier charakteristischer Plastizitätsformen, Langzeitdepression (LTD) und Paarpulsbahnung, auf Plastizitätsveränderungen überprüft. Dafür wurden *whole-cell* Ableitungen an der Purkinjenzelle mittels Patch-Clamp-Technik (Neher und Sakmann 1976; Hamill et al. 1981) an akuten Hirnschnitten des Kleinhirnkortex von heterozygoten R552H-Mäusen durchgeführt. Als Referenzgruppe dienten Wildtyp-Mäuse.

Zur Charakterisierung der Kletterfaser-Purkinjenzell-Synapse wurden die heterozygoten R552H-Mäuse (n=10) und Wildtyp-Mäuse (n=10) auf eine multiple Kletterfaserinnervation überprüft. In jeder Gruppe ergaben 90 % der Messungen eine Innervation der Purkinjenzelle durch eine Kletterfaser und 10 % eine Purkinjenzelle mit multipler Innervation, und somit ein normales Verhältnis (Hashimoto und Kano

2005). Eine überschwellige Kletterfaserstimulation führte in beiden Gruppen außerdem zu charakteristischen Aktionspotentialserien (*complex spikes*). Weiterhin zeigten die Kletterfaser-Purkinjezell-Synapsen der heterozygoten Mäuse und der Wildtyp-Mäuse das für diese Synapsen kennzeichnende Alles-oder-Nichts-Verhalten: Bei unterschwelliger Stimulation kann keine postsynaptische Antwort abgeleitet werden. Eine überschwellige Stimulation führt zu einer gleichbleibenden postsynaptischen Antwort, unabhängig von weiterer Steigerung der Stimulationsstärke. Zusammengefasst sprechen die Untersuchungen an der Kletterfaser-Purkinjezell-Synapse für eine normale Kletterfaser-Purkinjezell-Verschaltung der heterozygoten R552H-Mäuse.

Bei Charakterisierung der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse zeigten die heterozygoten R552H-Mäuse und die Wildtyp-Mäuse typische stimulationsstärke-abhängige postsynaptische Antworten mit charakteristischem Kurvenverlauf, die eine normale Parallelfaser-Purkinjezell-Verschaltung der heterozygoten R552H-Mäuse vermuten lassen. Folglich sprechen die Untersuchungen der erregenden Eingänge der Purkinjezelle für eine regelgerechte Verschaltung bei heterozygoten R552H-Mäusen.

Die Induktion von Langzeitdepression (LTD) an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse (Karachot et al. 1994) führte bei heterozygoten R552H-Mäusen (n=7) und Wildtyp-Mäusen (n=12) zu einer deutlichen Reduktion der postsynaptischen Antwort auf zirka 70 Prozent, die bis zum Ende der Messungen, 40 Minuten nach LTD-Induktion, stabil war. Diese Reduktion wurde mittels eines t-Tests für verbundene Stichproben ausgewertet. Bei beiden Gruppen war die Reduktion der Antworten signifikant (Wildtyp-Mäuse: $p < 0,001$, *degrees of freedom* (df)=11, $t=14,28$; heterozygote R552H-Mäuse: $p < 0,001$, df=6, $t=6,97$). Bei den Wildtyp-Mäusen entwickelte sich die LTD normal (Ito 2001) innerhalb von 20 Minuten, bei den heterozygoten R552H-Mäusen bereits direkt nach der Induktion. Eine statistische Quantifizierung dieses unterschiedlichen Zeitverlaufs bestätigte für die Wildtyp-Mäuse das graduelle Entstehen der LTD mit einem signifikanten Größenunterschied zwischen den Antworten der ersten zehn Minuten nach LTD-Induktion und der nachfolgenden zehn Minuten ($p < 0,025$, df=11, $t=2,63$ bis $2,87$). Für heterozygoten R552H-Mäusen ergab sich kein signifikanter Größenunterschied im Zeitverlauf ($p > 0,16$, df=6, $t=-0,29$ bis $1,28$). Somit zeigten heterozygote R552H-Mäuse im

Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine ebenso stabile LTD an der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse, jedoch mit einer signifikant schnelleren Verringerung der Antworten.

Zur Induktion von Paarpulsbahnung an der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse wurden die Parallelfasern von heterozygoten R552H-Mäusen (n=16) und Wildtyp-Mäusen (n=15) mit Paarpulsen (Interstimulusintervalle zwischen 10 ms und 100 ms) stimuliert. Aus den resultierenden Antwortkurven konnte das jeweilige Paarpulsverhältnis errechnet und auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mittels ANOVA überprüft werden. Für kurze Interstimulusintervalle (10-75 ms) war die Paarpulsbahnung bei den heterozygoten R552H-Mäusen signifikant verstärkt ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Für längere Interstimulusintervalle (100-200 ms) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

In dieser Arbeit konnten also Veränderungen der synaptischen Plastizität in stark FoxP2-exprimierenden Neuronen, den Purkinjenzellen im Kleinhirn, in einem Modell für die spezifische Sprachstörung beschrieben werden. Die KE-Mutation im FoxP2-Gen führt damit im Mausmodell zu Veränderungen in einer Hirnregion, die bereits mit der Generierung von Motorik und Sprache in Verbindung gebracht wird (Ackermann et al. 1992; Fiez und Raichle 1997; Lieberman 2002).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse unterstützen folglich die bestehende These, dass die Fähigkeit des Menschen zu sprechen aus sehr alten neuronalen Schaltkreisen hervorgeht, die eine bedeutende Rolle beim Erlernen von Motorik spielen (Lieberman 2002). Im Rahmen dieser Hypothese könnte es sein, dass Veränderungen in der synaptischen Plastizität an der Parallelfaser-Purkinjenzell-Synapse mit dafür verantwortlich sind, dass bei den heterozygoten Familienmitgliedern der KE-Familie eine Sprachstörung vorliegt.

Literatur:

Ackermann, H.; Vogel, M.; Petersen, D.; Poremba, M. (1992): Speech deficits in ischaemic cerebellar lesions. In: *J. Neurol.* 239, S. 223-227.

Aiba, A.; Kano, M.; Chen, C.; Stanton, M. E.; Fox, G. D.; Herrup, K. et al. (1994): Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. In: *Cell* 79, S. 377-388.

Belton, E.; Salmond, C. H.; Watkins, K. E.; Vargha-Khadem, F.; Gadian, D. G. (2003): Bilateral brain abnormalities associated with dominantly inherited verbal and orofacial dyspraxia. In: *Hum. Brain Mapp.* 18, S. 194-200.

Ferland, R. J.; Cherry, T. J.; Preware, P. O.; Morrisey, E. E.; Walsh, C. A. (2003): Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. In: *J. Comp. Neurol.* 460, S. 266-279.

Fiez, J. A.; Raichle, M. E. (1997): Linguistic processing. In: *Int. Rev. Neurobiol* 41, S. 233-254.

Groszer, M.; Keays, D. A.; Deacon, R. M. J.; de Bono, J. P.; Prasad-Mulcare, S.; Gaub, S. et al. (2008): Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits. In: *Curr. Biol.* 18, S. 354-362.

Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. In: *Pflügers Arch.* 391, S. 85-100.

Hashimoto, K.; Kano, M. (2005): Postnatal development and synapse elimination of climbing fiber to Purkinje cell projection in the cerebellum. In: *Neurosci. Res.* 53, S. 221-228.

Ichikawa, R.; Miyazaki, T.; Kano, M.; Hashikawa, T.; Tatsumi, H.; Sakimura, K. et al. (2002): Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor delta 2. In: *J. Neurosci.* 22, S. 8487-8503.

Ito, M. (2001): Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. In: *Physiol. Rev.* 81, S. 1143-1195.

Kano, M.; Hashimoto, K.; Kurihara, H.; Watanabe, M.; Inoue, Y.; Aiba, A.; Tonegawa, S. (1997): Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking mGluR1. In: *Neuron* 18, S. 71-79.

- Kano, M.; Hashimoto, K.; Watanabe, M.; Kurihara, H.; Offermanns, S.; Jiang, H. et al. (1998): Phospholipase cbeta4 is specifically involved in climbing fiber synapse elimination in the developing cerebellum. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, S. 15724-15729.
- Karachot, L.; Kado, R. T.; Ito, M. (1994): Stimulus parameters for induction of long-term depression in in vitro rat Purkinje cells. In: *Neurosci. Res.* 21, S. 161-168.
- Lai, C. S.; Fisher, S. E.; Hurst, J. A.; Vargha-Khadem, F.; Monaco, A. P. (2001): A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. In: *Nature* 413, S. 519-523.
- Lieberman, P. (2002): On the nature and evolution of the neural bases of human language. In: *Am. J. Phys. Anthropol. Suppl.* 35, S. 36-62.
- Matsukawa, H.; Wolf, A. M.; Matsushita, S.; Joho, R. H.; Knöpfel, T. (2003): Motor dysfunction and altered synaptic transmission at the parallel fiber-Purkinje cell synapse in mice lacking potassium channels Kv3.1 and Kv3.3. In: *J. Neurosci.* 23, S. 7677-7684.
- Miyata, M.; Kim, H. T.; Hashimoto, K.; Lee, T. K.; Cho, S. Y.; Jiang, H. et al. (2001): Deficient long-term synaptic depression in the rostral cerebellum correlated with impaired motor learning in phospholipase C beta4 mutant mice. In: *Eur. J. Neurosci.* 13, S. 1945-1954.
- Neher, E.; Sakmann, B. (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. In: *Nature* 260 (5554), S. 799-802.
- Shu, W.; Cho, J. Y.; Jiang, Y.; Zhang, M.; Weisz, D.; Elder, G. A. et al. (2005): Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, S. 9643-9648.
- Steinberg, J. P.; Takamiya, K.; Shen, Y.; Xia, J.; Rubio, M. E.; Yu, S. et al. (2006): Targeted in vivo mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its interacting protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression. In: *Neuron* 49, S. 845-860.
- Watkins, K. E.; Vargha-Khadem, F.; Ashburner, J.; Passingham, R. E.; Connelly, A.; Friston, K. J. et al. (2002): MRI analysis of an inherited speech and language disorder: structural brain abnormalities. In: *Brain* 125, S. 465-478.

7 Literaturverzeichnis

- Ackermann, H.; Vogel, M.; Petersen, D.; Poremba, M. (1992): Speech deficits in ischaemic cerebellar lesions. In: *J. Neurol.* 239, S. 223-227.
- Ackermann, H. (2008): Cerebellar contributions to speech production and speech perception: psycholinguistic and neurobiological perspectives. In: *Trends Neurosci.* 31, S. 265-272.
- Aiba, A.; Kano, M.; Chen, C.; Stanton, M. E.; Fox, G. D.; Herrup, K. et al. (1994): Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. In: *Cell* 79, S. 377-388.
- Atluri, P. P.; Regehr, W. G. (1996): Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. In: *J. Neurosci.* 16, S. 5661-5671.
- Bayascas, J. R. (2006): Evaluation of approaches to generation of tissue-specific knock-in mice. In: *J. Biol. Chem.* 281, S. 28772-28781.
- Belton, E.; Salmond, C. H.; Watkins, K. E.; Vargha-Khadem, F.; Gadian, D. G. (2003): Bilateral brain abnormalities associated with dominantly inherited verbal and orofacial dyspraxia. In: *Hum. Brain Mapp.* 18, S. 194-200.
- Cox, R. D.; Brown, S. D. M. (2003): Rodent models of genetic disease. In: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, S. 278-283.
- Eccles, J. C. (1973): The cerebellum as a computer: patterns in space and time. In: *J. Physiol. (Lond.)* 229, S. 1-32.
- Edwards, F. A.; Konnerth, A.; Sakmann, B.; Takahashi, T. (1989): A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. In: *Pflügers Arch.* 414, S. 600-612.
- Enard, W.; Przeworski, M.; Fisher, S. E.; Lai, C. S. L.; Wiebe, V.; Kitano, T. et al. (2002): Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. In: *Nature* 418, S. 869-872.
- Enard, W.; Gehre, S.; Hammerschmidt, K.; Hölter, S. M.; Blass, T.; Somel, M. et al. (2009): A humanized version of Foxp2 affects cortico-basal ganglia circuits in mice. In: *Cell* 137, S. 961-971.
- Ferland, R. J.; Cherry, T. J.; Preware, P. O.; Morrisey, E. E.; Walsh, C. A. (2003): Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. In: *J. Comp. Neurol.* 460, S. 266-279.

- Fiez, J. A.; Raichle, M. E. (1997): Linguistic processing. In: *Int. Rev. Neurobiol* 41, S. 233-254.
- Fisher, S. E.; Vargha-Khadem, F.; Watkins, K. E.; Monaco, A. P.; Pembrey, M. E. (1998): Localisation of a gene implicated in a severe speech and language disorder. In: *Nat. Genet.* 18, S. 168-170.
- Fletcher, Paul (1990): Speech and language defects. Scientific correspondence. In: *Nature* 346, S. 226.
- French, C. A.; Groszer, M.; Preece, C.; Coupe, A.; Rajewsky, K.; Fisher, S. E. (2007): Generation of mice with a conditional Foxp2 null allele. In: *Genesis* 45, S. 440-446.
- Gopnik, M. (1990): Feature-blind grammar and dysphagia. In: *Nature* 344, S. 715.
- Groszer, M.; Keays, D. A.; Deacon, R. M. J.; de Bono, J. P.; Prasad-Mulcare, S.; Gaub, S. et al. (2008): Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits. In: *Curr. Biol.* 18, S. 354-362.
- Hallermann, S.; Fejtova, A.; Schmidt, H.; Weyhersmüller, A.; Silver, R. A.; Gundelfinger, E. D.; Eilers, J. (2010): Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse. In: *Neuron* 68, S. 710-723.
- Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. In: *Pflügers Arch.* 391, S. 85-100.
- Hansel, C.; de Jeu, M.; Belmeguenai, A.; Houtman, S. H.; Buitendijk, G. H. S.; Andreev, D. et al. (2006): alphaCaMKII is essential for cerebellar LTD and motor learning. In: *Neuron* 51, S. 835-843.
- Hashimoto, K.; Kano, M. (2005): Postnatal development and synapse elimination of climbing fiber to Purkinje cell projection in the cerebellum. In: *Neurosci. Res.* 53, S. 221-228.
- Ichikawa, R.; Miyazaki, T.; Kano, M.; Hashikawa, T.; Tatsumi, H.; Sakimura, K. et al. (2002): Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor delta 2. In: *J. Neurosci.* 22, S. 8487-8503.
- Ito, M. (1984): *The cerebellum and neural control*. New York: Raven Press.
- Ito, M. (2001): Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. In: *Physiol. Rev.* 81, S. 1143-1195.

- Kano, M.; Hashimoto, K.; Kurihara, H.; Watanabe, M.; Inoue, Y.; Aiba, A.; Tonogawa, S. (1997): Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking mGluR1. In: *Neuron* 18, S. 71-79.
- Kano, M.; Hashimoto, K.; Watanabe, M.; Kurihara, H.; Offermanns, S.; Jiang, H. et al. (1998): Phospholipase cbeta4 is specifically involved in climbing fiber synapse elimination in the developing cerebellum. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, S. 15724-15729.
- Karachot, L.; Kado, R. T.; Ito, M. (1994): Stimulus parameters for induction of long-term depression in in vitro rat Purkinje cells. In: *Neurosci. Res.* 21, S. 161-168.
- Konnerth, A.; Llano, I.; Armstrong, C. M. (1990): Synaptic currents in cerebellar Purkinje cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, S. 2662-2665.
- Konopka, G.; Bomar, J. M.; Winden, K.; Coppola, G.; Jonsson, Z. O.; Gao, F. et al. (2009): Human-specific transcriptional regulation of CNS development genes by FOXP2. In: *Nature* 462, S. 213-217.
- Kwan, K. (2002): Conditional alleles in mice: Practical considerations for tissue-specific knockouts. In: *Genesis* 32, S. 49-62.
- Lai, C. S.; Fisher, S. E.; Hurst, J. A.; Vargha-Khadem, F.; Monaco, A. P. (2001): A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. In: *Nature* 413, S. 519-523.
- Lai, C. S. L.; Gerrelli, D.; Monaco, A. P.; Fisher, S. E.; Copp, A. J. (2003): FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. In: *Brain* 126, S. 2455-2462.
- Lieberman, P. (1984): *The biology and evolution of language*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
- Lieberman, P. (2002): On the nature and evolution of the neural bases of human language. In: *Am. J. Phys. Anthropol. Suppl.* 35, S. 36-62.
- Lieberman, P. (2006): *Toward an evolutionary biology of language*. Cambridge, Mass.: Belknap Press of Harvard Univ. Press.
- MacDermot, K. D.; Bonora, E.; Sykes, N.; Coupe, A.; Lai, C. S. L.; Vernes, S. C. et al. (2005): Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. In: *Am. J. Hum. Genet.* 76, S. 1074-1080.
- Malenka, R. C.; Kocsis, J. D.; Ransom, B. R.; Waxman, S. G. (1981): Modulation of parallel fiber excitability by postsynaptically mediated changes in extracellular potassium. In: *Science* 214, S. 339-341.

- Matsukawa, H.; Wolf, A. M.; Matsushita, S.; Joho, R. H.; Knöpfel, T. (2003): Motor dysfunction and altered synaptic transmission at the parallel fiber-Purkinje cell synapse in mice lacking potassium channels Kv3.1 and Kv3.3. In: *J. Neurosci.* 23, S. 7677-7684.
- Middleton, F. A.; Strick, P. L. (2000): Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. In: *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31, S. 236-250.
- Miyata, M.; Kim, H. T.; Hashimoto, K.; Lee, T. K.; Cho, S. Y.; Jiang, H. et al. (2001): Deficient long-term synaptic depression in the rostral cerebellum correlated with impaired motor learning in phospholipase C beta4 mutant mice. In: *Eur. J. Neurosci.* 13, S. 1945-1954.
- Neher, E.; Sakmann, B. (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. In: *Nature* 260 (5554), S. 799-802.
- Pinker, S. (1994): The language instinct: the new science of language and mind: Harmondsworth, Penguin Books.
- Plant, T. D.; Eilers, J.; Konnerth, A. (1995): Patch-clamp technique in brain slices. In: Boulton, A. A.; Baker, G. B.; Walz, W. (Hg.): Patch-clamp applications and protocols. Totowa, NJ: Humana Press, S. 233-258.
- Plomin, R.; Haworth, C. M. A.; Davis, O. S. P. (2009): Common disorders are quantitative traits. In: *Nat. Rev. Genet.* 10, S. 872-878.
- Reimers-Kipping, S.; Hevers, W.; Pääbo, S.; Enard, W. (2011): Humanized Foxp2 specifically affects cortico-basal ganglia circuits. In: *Neuroscience* 175C, S. 75-84.
- Shu, W.; Cho, J. Y.; Jiang, Y.; Zhang, M.; Weisz, D.; Elder, G. A. et al. (2005): Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, S. 9643-9648.
- Shu, W.; Lu, M. M.; Zhang, Y.; Tucker, P. W.; Zhou, D.; Morrissey, E. E. (2007): Foxp2 and Foxp1 cooperatively regulate lung and esophagus development. In: *Develop.* 134, S. 1991-2000.
- Skvorak, K.; Vissel, B.; Homanics, G. E. (2006): Production of conditional point mutant knockin mice. In: *Genesis* 44, S. 345-353.
- Spiteri, E.; Konopka, G.; Coppola, G.; Bomar, J.; Oldham, M.; Ou, J. et al. (2007): Identification of the transcriptional targets of FOXP2, a gene linked to speech and language, in developing human brain. In: *Am. J. Hum. Genet.* 81, S. 1144-1157.
- Steinberg, J. P.; Takamiya, K.; Shen, Y.; Xia, J.; Rubio, M. E.; Yu, S. et al. (2006): Targeted in vivo mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its interacting

- protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression. In: *Neuron* 49, S. 845-860.
- Timmann, D.; Daum, I. (2007): Cerebellar contributions to cognitive functions: a progress report after two decades of research. In: *Cerebellum* 6, S. 159-162.
- Tuteja, G.; Kaestner, K. H. (2007a): SnapShot: Forkhead transcription factors I. In: *Cell* 130, S. 1160, 1160.e1.
- Tuteja, G.; Kaestner, K. H. (2007b): SnapShot: Forkhead transcription factors II. In: *Cell* 131, S. 192, 192.e1.
- Vargha-Kadem, F. (1990): Speech and language defects. Scientific correspondence. In: *Nature* 346, S. 226.
- Vargha-Khadem, F.; Watkins, K. E.; Price, C. J.; Ashburner, J.; Alcock, K. J.; Connelly, A. et al. (1998): Neural basis of an inherited speech and language disorder. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, S. 12695-12700.
- Vargha-Khadem, F.; Gadian, D. G.; Copp, A.; Mishkin, M. (2005): FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 6, S. 131-138.
- Vernes, S. C.; Spiteri, E.; Nicod, J.; Groszer, M.; Taylor, J. M.; Davies, K. E. et al. (2007): High-throughput analysis of promoter occupancy reveals direct neural targets of FOXP2, a gene mutated in speech and language disorders. In: *Am. J. Hum. Genet* 81, S. 1232-1250.
- Watkins, K. E.; Dronkers, N. F.; Vargha-Khadem, F. (2002a): Behavioural analysis of an inherited speech and language disorder: comparison with acquired aphasia. In: *Brain* 125, S. 452-464.
- Watkins, K. E.; Vargha-Khadem, F.; Ashburner, J.; Passingham, R. E.; Connelly, A.; Friston, K. J. et al. (2002b): MRI analysis of an inherited speech and language disorder: structural brain abnormalities. In: *Brain* 125, S. 465-478.
- Zucker, R. S.; Regehr, W. G. (2002): Short-term synaptic plasticity. In: *Annu. Rev. Physiol.* 64, S. 355-405.

8 Anhang

8.1 Groszer et al. 2008

Current Biology 18, 1–9, March 11, 2008 ©2008 Elsevier Ltd All rights reserved DOI 10.1016/j.cub.2008.01.060

Report

Impaired Synaptic Plasticity and Motor Learning in Mice with a Point Mutation Implicated in Human Speech Deficits

Matthias Groszer,¹ David A. Keays,¹ Robert M.J. Deacon,² Joseph P. de Bono,³ Shweta Prasad-Mulcare,⁴ Simone Gaub,⁵ Muriel G. Baum,⁶ Catherine A. French,¹ Jérôme Nicod,¹ Julie A. Coventry,¹ Wolfgang Enard,⁷ Martin Fray,⁸ Steve D.M. Brown,⁸ Patrick M. Nolan,⁸ Svante Pääbo,⁷ Keith M. Channon,³ Rui M. Costa,⁴ Jens Eilers,⁶ Günter Ehret,⁵ J. Nicholas P. Rawlins,² and Simon E. Fisher^{1,*}

¹Wellcome Trust Centre for Human Genetics
University of Oxford
Roosevelt Drive
Oxford OX3 7BN
United Kingdom

²Department of Experimental Psychology
University of Oxford
South Parks Road
Oxford OX1 3UD
United Kingdom

³Department of Cardiovascular Medicine
University of Oxford
John Radcliffe Hospital
Headington

Oxford OX3 9DU
United Kingdom
⁴Laboratory for Integrative Neuroscience
National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
National Institutes of Health
5625 Fishers Lane
Room TS-20D, MSC 9411
Bethesda, Maryland 20852-9411

⁵Institute of Neurobiology
University of Ulm
89069 Ulm
Germany

⁶Carl-Ludwig-Institute for Physiology
University of Leipzig
04103 Leipzig
Germany

⁷Max-Planck Institute for Evolutionary Anthropology
Deutscher Platz 6
04103 Leipzig
Germany

⁸Medical Research Council Mammalian Genetics Unit
Harwell, Didcot
Oxfordshire OX11 0RD
United Kingdom

Summary

The most well-described example of an inherited speech and language disorder is that observed in the multigenerational KE family, caused by a heterozygous missense mutation in the *FOXP2* gene [1]. Affected individuals are characterized by deficits in the learning and production of complex

orofacial motor sequences underlying fluent speech and display impaired linguistic processing for both spoken and written language [2]. The *FOXP2* transcription factor is highly similar in many vertebrate species, with conserved expression in neural circuits related to sensorimotor integration and motor learning [3, 4]. In this study, we generated mice carrying an identical point mutation to that of the KE family, yielding the equivalent arginine-to-histidine substitution in the *Foxp2* DNA-binding domain. Homozygous R552H mice show severe reductions in cerebellar growth and postnatal weight gain but are able to produce complex innate ultrasonic vocalizations. Heterozygous R552H mice are overtly normal in brain structure and development. Crucially, although their baseline motor abilities appear to be identical to wild-type littermates, R552H heterozygotes display significant deficits in species-typical motor-skill learning, accompanied by abnormal synaptic plasticity in striatal and cerebellar neural circuits.

Results and Discussion

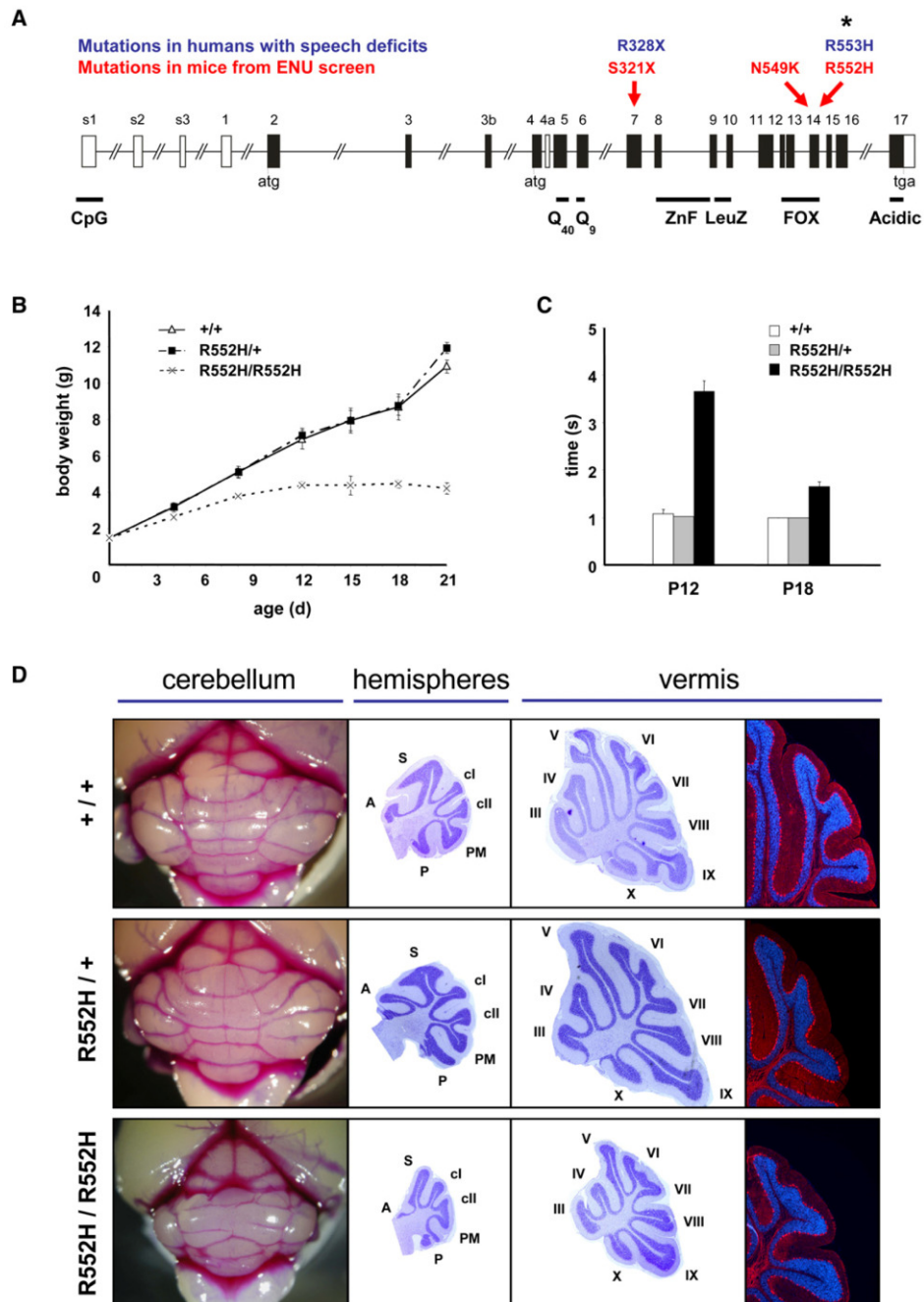
An Allelic Series of Mice Carrying *Foxp2* Point Mutations

By using gene-driven *N-ethyl-N-nitrosourea* (ENU) mutagenesis screening [5], we generated mice with distinct point mutations in *Foxp2*, backcrossed onto clean genomic backgrounds (Figure 1A; Figure S1 and Supplemental Experimental Procedures available online). The *Foxp2-R552H* line carries an arginine-to-histidine substitution identical to the R553H substitution in affected members of the KE family [1], disrupting DNA-binding and transactivation properties [6]. *Foxp2-N549K* mice harbor a substitution nearby, at another conserved site of the DNA-binding domain. The *Foxp2-S321X* line carries a premature stop codon close to the human R328X nonsense mutation found in a second family segregating *FOXP2*-related speech and language deficits [7]. Although levels of *Foxp2* mRNA and protein are normal in R552H and N549K mutants, S321X homozygotes show reduced quantities of *Foxp2* messenger RNA (mRNA) (likely due to nonsense-mediated RNA decay), absence of *Foxp2* protein, and no detectable truncated product (Figure S1). Intermediate levels of mRNA and protein are observed for S321X heterozygotes. Thus, S321X is effectively a null allele, implying a similar mechanism for the human R328X mutation [7].

R552H and S321X homozygotes show reduced weight gain, which is not explained by feeding difficulties or lack of maternal care (Figure 1B, Figure S2A). They display delayed maturation of the righting reflex (Figure 1C, Figure S2B), and die approximately 3–4 weeks after birth. The developing lung is a site of *Foxp2* expression; complete *Foxp2* loss in knockout mice yields postnatal dilation of distal airspaces, although ultrastructural examinations have found number and morphology of alveolar epithelial cells to be normal [8]. We assessed the hematocrit of R552H and S321X homozygotes (Figure S3). Levels were indistinguishable from wild-type animals, indicating no major oxygenation deficits.

We carried out histological analyses of forebrain structures at P21 in mutants, including conserved *Foxp2* expression sites in the cortex, striatum, and thalamus [9, 10], and found no gross

*Correspondence: simon.fisher@well.ox.ac.uk

Figure 1. *Foxp2-R552H* Mutant Mice

(A) Allelic series for mouse *Foxp2*. Mutations from gene-driven ENU mutagenesis screens are shown above a schematic of the murine *Foxp2* locus, spanning more than 500 kb of genomic DNA. Superimposed are *FOXP2* point mutations found in humans with speech and language disorders. Asterisk indicates the KE family mutation. Murine *Foxp2* is one amino acid shorter than human *FOXP2* because of a shorter polyglutamine tract (Q9 instead of Q10); hence, R552H in mice corresponds to R553H in humans.

(B) Time course of postnatal bodyweight development. Homozygous R552H mice ($n = 5$) show a strongly reduced weight gain, despite feeding normally and receiving similar maternal care to littermates. Development of heterozygotes ($n = 13$) is indistinguishable from that of wild-type littermates ($n = 8$) (mean \pm standard error of the mean [SEM]).

abnormalities. However, the cerebellum of homozygotes was disproportionately small, with decreased foliation (Figure 1D; Figure S4). Despite this reduced volume, cerebellar histoarchitecture at P21 remained intact—Purkinje cells (PCs) aligned in a continuous row, and granule cells had completed migration into the internal granular layer (Figure 1D; Figure S4). N549K homozygotes display comparable deficits in postnatal development and cerebellar volume to R552H and S321X homozygotes, but symptoms are milder and show variable expressivity, with prolonged survival (3–5 months).

Consistently across the allelic series, our heterozygous *Foxp2* mutants are fully viable and healthy, without delays in weight gain or in righting-reflex maturation (Figures 1B and 1C, Figure S2). Heterozygote brain development appears grossly normal, even for the cerebellum, where size and histoarchitecture do not differ from wild-types (Figure 1D, Figure S4).

Foxp2-R552H Heterozygotes Display Impaired Motor-Skill Learning

Understanding of the neural bases of *FOXP2*-related disorder in humans comes primarily from investigations of the KE family. Affected family members carry a heterozygous R553H mutation yielding difficulties in sequencing mouth movements, as well as impaired expressive and receptive language [2]. Structural neuroimaging has shown that brains of affected people are overtly normal, but voxel-based morphometry detected subtle changes in gray-matter density, most notably in the inferior frontal gyrus, striatum, and cerebellum [11]. Functional neuroimaging revealed abnormalities during covert (silent) language tasks, including underactivation of the inferior frontal gyrus and putamen [12]. Thus, it has been proposed that this heterozygous R553H mutation affects frontostriatal and/or frontocerebellar networks involved in learning, planning, and execution of rapid movement sequences [4]. Our *Foxp2-R552H* heterozygous mice facilitated the first in vivo investigations of this KE point mutation in an animal model.

R552H heterozygotes show normal embryonic and postnatal development (Figure 1) and base-line motor abilities (Table S1, Figure S5). We assessed motor-skill learning by using a tilted voluntary running-wheel system that enables investigations of species-typical motor patterns in home-cage environments without being confounded by stress responses to handling or disrupted diurnal rhythms [13]. All mice spent a substantial amount of time on the wheels, running in typical short bouts (Figure 2A). After the first day, bout length showed a characteristic rapid increase, accompanied by a steep drop in bout number (Figures 2B and 2C). These rapid early changes in motor patterns reflect behavioral learning rather than alterations in cardiovascular fitness [13]. Importantly, genotype did not affect performance on the first day. However, R552H heterozygotes subsequently displayed slower increases in bout length than wild-type littermates, paralleled by more gradual declines in bout number (Figures 2B and 2C), indicating significant ($p < 0.005$) deficits in learning to use the wheel. Furthermore,

the rate of increase in average running speed, a separate index of motor-skill learning [13], was significantly lower in heterozygotes ($p < 0.01$; Figure 2D).

Although *Foxp2* is expressed in the developing lung, these findings cannot be explained by respiratory impairment. Throughout voluntary training, there was no effect of genotype on time spent running, indicating similar fitness and motivation in R552H heterozygotes and wild-type littermates (Figure 2A). At the outset, heterozygotes showed normal performance—on day 1, average speed, distance, time spent running, bout length, and bout number did not differ from those of wild-types (Figures 2A–2D). Furthermore, although heterozygotes are slower to learn, they do achieve rapid speeds (Figure 2D), and bout length and bout number eventually reach wild-type levels. Finally, in studies of targeted *Foxp2* knockouts (see below), extensive investigations of postnatal lung alveolarization and distal airways did not detect any lung abnormalities in heterozygotes [8].

To further exclude respiratory confounds, we studied independent cohorts of R552H heterozygotes by using accelerating rotarods, an alternative paradigm routinely used for the assessment of rodent motor-skill learning [14]. On the first trials, heterozygotes performed similarly to wild-type littermates, but they subsequently improved at significantly slower rates ($p < 0.0001$; Figure 2E), mirroring the voluntary running-wheel data. R552H heterozygotes did not show enhanced anxiety in the elevated-plus-maze or open-field arena, altered spontaneous locomotor activity in automated recordings, general cognitive deficits in the T maze, or abnormal grooming (Table S1, Figure S5).

Foxp2-R552H Heterozygotes Show Abnormal Synaptic Plasticity

Previous work highlighted the cortex, striatum and cerebellum (specifically PCs and deep cerebellar nuclei) as key sites of embryonic and postnatal *Foxp2* expression [9, 10]. Corticostriatal and corticocerebellar circuits are known to mediate motor-skill learning [15], although their potential distinctive contributions to such abilities remain unclear. Given the absence of overt morphological abnormalities in R552H heterozygous brains, we used electrophysiology to assess functional properties of striatal and cerebellar neurons from these animals.

For assessment of striatal function, we recorded evoked field potentials from the dorsolateral striatum, a region previously implicated in skill learning on the accelerating rotarod [16–18]. The input-output function—reflecting the amplitude of the evoked population spike in relation to the stimulation strength—was similar between R552H heterozygotes and wild-type littermates (Figure 3A). There were also no differences in the stimulation strength necessary to evoke half of the maximum response (WT = 0.92 ± 0.11 mA, R552H = 0.90 ± 0.13 mA, $t_{15} = 0.12$, $p > 0.05$). Thus, R552H heterozygotes do not display major abnormalities in synaptic organization or transmission in the dorsolateral striatum.

(C) Postnatal righting-reflex development. Homozygous R552H mice ($n = 8$) display a significantly delayed righting reflex. Heterozygotes ($n = 15$) are indistinguishable from wild-type littermates ($n = 4$) (mean \pm SEM).

(D) Cerebellar morphology at postnatal day 21 in wild-type (top row), heterozygous (middle), and homozygous R552H mice (bottom). Homozygotes display reduced cerebellar size (left-hand column) and foliation deficits in hemispheres and vermis (middle columns, cresyl violet staining). Nevertheless, Purkinje cells are aligned in a monolayer (right-hand column) as revealed by anti-calbindin immunohistochemistry (red) and DAPI nuclear staining (blue). Heterozygotes show no detectable alterations in cerebellar size, foliation, or layering. Vermis lobules are labeled III-X; hemispheric lobules are anterior (A), simplex (S), crus I (cl), crus II (cII), paramedian (PM), and pyramidal (P). All photographs taken at the same magnification. Concordant findings from other mutations of the allelic series are shown in Figures S1–S4.

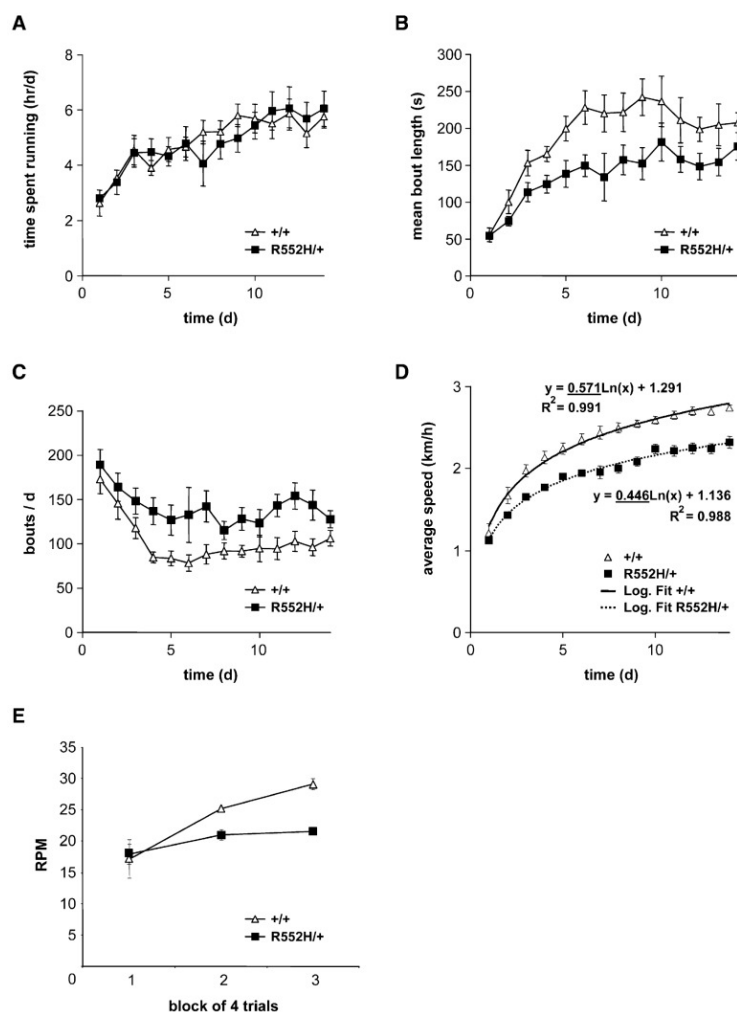


Figure 2. Impaired Motor-Skill Learning of *Foxp2-R552H* Heterozygous Mice on Voluntary Running-Wheel Systems and Accelerating Rotarods

(A) Heterozygous R552H mice ($n = 9$) and wild-type littermates ($n = 9$) spend the same amount of time running per day (AUC [38], t test, $p = 0.95$), indicating similar motivation, fitness, and levels of fatigue.

(B) Mean bout length per day shows a sharp increase as mice learn to use the wheel. However, heterozygous R552H mice do not learn as rapidly as wild-type littermates, and hence run significantly shorter bout lengths during the 2 week period (AUC, t test, $p < 0.05$). Note that performance is equivalent on day 1 and that heterozygotes and wild-types converge toward the end of the test period.

(C) Mean bout number per day shows a characteristically steep drop after the first day. Although performance is equivalent at the outset, heterozygous R552H mice display a more gradual decrease than do wild-type littermates and thus run significantly increased bout numbers (AUC, t test, $p < 0.005$). Again, wild-type and heterozygous performance converges toward end of the 2 week period.

(D) Heterozygous R552H mice display significantly reduced average speeds (AUC, t test, $p < 0.0001$). There is no speed difference on day 1, but the subsequent rate of learning is significantly slower in heterozygous mice compared to wild-type littermates (slope of the logarithmic curve fit, $p < 0.01$).

(E) An independent cohort of heterozygous R552H mice ($n = 10$) display deficits in motor-skill learning compared to wild-types ($n = 10$) during learning on the accelerating rotarod (analysis of variance [ANOVA] of trials \times genotype, $p < 0.0001$) (RPM indicates revolutions per minute). All panels show mean \pm SEM.

We next examined synaptic plasticity in this region, investigating long-term depression (LTD) at glutamatergic synapses induced by high-frequency stimulation, a form of plasticity mediated by endocannabinoid retrograde signaling [19–21]. There were significant differences in striatal synaptic plasticity between wild-type mice and R552H heterozygotes ($p < 0.05$), with only the former displaying significant LTD (Figure 3B). In contrast, R552H heterozygotes showed depression of the evoked responses immediately after high-frequency stimulation, but no LTD ($p > 0.05$). These data indicate that LTD in the dorsolateral striatum of R552H heterozygotes is strongly impaired.

For examination of cerebellar circuits, we employed electrophysiological recordings and Ca^{2+} imaging to assess climbing-fiber (CF) and parallel-fiber (PF) inputs of PCs in acute slices. CF fibers undergo a characteristic elimination of redundant inputs during the first two postnatal weeks. Disturbed cerebellar development typically yields multiple weak CF inputs that fail to form strong one-to-one multisite synaptic contacts with the

PC [22]. CF-induced inputs in R552H heterozygotes were normal, with no indication of disturbed CF elimination (Figures S6A–S6C). Regardless of genotype, only about 10% of PCs showed multiple CF innervation, typical for normal development [22]. Furthermore, CF stimulation triggered full-blown dendritic Ca^{2+} transients with peak amplitudes and temporal integrals indiscernible from those of wild-types (Figures S6A and S6B). Similarly, activation of PF inputs yielded normal excitatory postsynaptic potentials mediated by AMPA-type glutamate receptors. Therefore, R552H heterozygotes display a grossly normal cerebellar synaptic circuitry.

We went on to assess two types of cerebellar synaptic plasticity. (1) Paired-pulse facilitation of the PF-PC synapse represents a form of short-term plasticity resulting primarily from enhanced presynaptic transmitter release due to residual Ca^{2+} ions [23] and partly from extracellular K^+ accumulation [24]. Paired-pulse facilitation in R552H heterozygotes was significantly ($p < 0.01$) enhanced at short interstimulus intervals (10–75 msec) as compared to that in wild-type littermates,

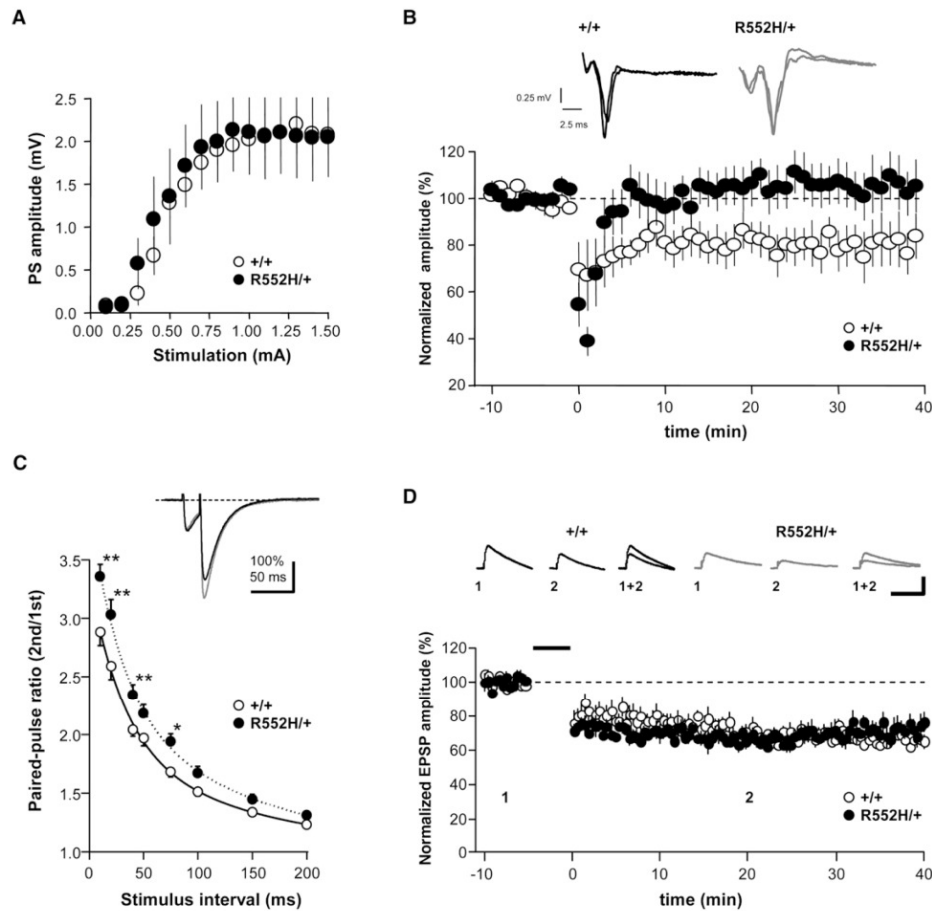


Figure 3. Abnormal Synaptic Plasticity of *Foxp2-R552H* Heterozygous Mice in the Striatum and Cerebellum

(A) Input-output functions of evoked potentials in dorsolateral striatum for R552H heterozygous ($n = 5$) and wild-type ($n = 5$) mice (mean \pm SEM). There was no significant interaction between genotype and function ($F_{1,4,70} = 0.12, p > 0.05$).

(B) Summary LTD data in dorsolateral striatum for R552H heterozygous ($n = 7$) and wild-type ($n = 6$) mice, showing mean amplitudes for every minute (mean \pm SEM). Representative traces during baseline and after high frequency stimulation are shown at the top. There was a significant interaction between genotype and LTD ($F_{55,605} = 2.62, p < 0.05$). Wild-type mice showed significant striatal LTD (post hoc, $p < 0.05$), whereas R552H heterozygotes did not (post hoc, $p > 0.05$).

(C) Paired-pulse facilitation of PF inputs to cerebellar PCs in R552H heterozygous ($n = 16$) and wild-type ($n = 15$) mice show significant differences at short interstimulus intervals (ANOVA, * indicates $p < 0.05$, ** indicates $p < 0.01$, mean \pm SEM). Solid and dashed lines represent double exponential fits to the data. Example traces (average of five EPSCs) for a stimulus interval of 20 ms are shown in the inset.

(D) Summary LTD data in PCs from R552H heterozygous ($n = 7$) and wild-type ($n = 12$) mice (mean \pm SEM). The black bar indicates the induction period (300 combined CF-PF stimulations at 1 Hz). Example traces (average of 12 EPSPs) from indicated time points are shown at the top. Stimulation artifacts were clipped for clarity. Scale bars are 2mV and 50 ms. Significant LTD was induced in PCs of both groups, indicated by paired t tests comparing for each animal the average baseline level with the average value during final 10 min of recording [39] (R552H heterozygotes, $df = 6, t = 6.07, p < 0.001$; wild-type, $df = 11, t = 14.28, p < 0.001$). In wild-types, there was a gradual establishment of LTD, with a significant drop in EPSPs between the initial 10 min postinduction and subsequent 10 min windows ($t = 2.63-2.87, p < 0.025, df = 11$). In contrast, heterozygotes showed more immediate and stable depression of EPSPs (comparison of initial 10 min postinduction to subsequent 10 min windows; $t = -0.29-1.28, p > 0.16, df = 6$).

with no detectable differences between genotypes at longer intervals (Figure 3C). (2) LTD at PF-PC synapses has been proposed as a cellular substrate of motor-skill learning in the cerebellum [25]. Simultaneous PF-CF activation induced robust LTD of similar magnitude in PCs of both groups. However, we detected subtle differences in the temporal profile in R552H heterozygotes as compared to wild-types, consistent with faster induction of LTD in the former (Figure 3D).

Vocalizations of *Foxp2-R552H* Mutants

Finally, prompted by a recent study [26], we investigated innate vocalizations of R552H mutants. Rodents produce three sound types, broadband audible, pure ultrasonic, and broadband click sounds, that differ substantially in physical structure and production mechanisms. In particular, although audible sounds are produced by the vibration of vocal cords, ultrasonic sounds appear to be generated by expiration through a small

opening between arytenoid cartilages with otherwise tightly opposed, nonvibrating vocal cords (like a whistle) [27, 28]. Thus, ultrasound emission is likely to require more muscle power due to greater airway resistance.

We initially studied isolation calls. Young pups when isolated from the nest emit frequency-modulated tones in the high ultrasonic range (here called USIs), accompanied by clicks [29]. When comparing R552H heterozygotes to wild-type littermates, we found no significant difference in numbers of USIs produced (Figure 4A) or in their general characteristics (e.g., call duration, peak sound-pressure level, minimum and maximum frequency, and mean number of calls in a series). However, R552H homozygotes did not emit any USIs. Importantly, USIs elicit a phonotactic approach in adults, a response resembling that of humans toward crying babies. Pup ultrasounds reflect a modulated arousal state yielding altered motor activity, including ultrasound production, rather than a motivation to acoustically communicate [30, 31]. Thus, the absence of homozygous USIs could potentially result from reduced arousal in isolation as compared to wild-type and heterozygous animals.

Therefore, we next employed situations yielding higher arousal and stronger efforts to vocalize. When newborns are lifted a short distance above the ground (Supplemental Experimental Procedures), they emit audible distress calls (DCs) with interspersed ultrasounds (here called USDs) and clicks. We compared USDs to USIs in wild-type mice, finding that USDs are louder (higher peak sound-pressure level) and longer (Figure 4B), consistent with greater arousal in the distress condition. R552H homozygotes, heterozygotes, and wild-type littermates emitted equivalent numbers of DCs (Figure 4C), indicating similar arousal in the different groups. All mice also produced USDs (Figure 4C). Thus, in these conditions, R552H homozygotes generate both harmonically structured audible calls and complex ultrasonic whistles, suggesting that neural mechanisms of motor coordination for ultrasound production are intact (Figure 4D).

Nevertheless, R552H homozygotes emitted significantly fewer USDs than did wild-type and heterozygous littermates (Figure 4C). A parsimonious interpretation is that the difficulties of homozygotes in making ultrasounds might be secondary to their severe developmental delays, gross motor difficulties, and/or reduced physical well being. USDs of homozygotes have lower sound-pressure levels and shorter duration than those of heterozygotes and wild-types (Figure 4E). Moreover, R552H homozygotes emit significantly more clicks under distress than do wild-types (Figure 4F). Clicks often precede USDs and so might indicate the intention of mice to produce USDs. Indeed, if numbers of clicks and USDs are summed, the total number of produced sounds is similar in all groups (Figure 4F), concordant with R552H homozygotes' being equivalently aroused under distress but physically less able to produce ultrasounds.

Comparison to Targeted Knockouts

Previously, Shu and colleagues used standard gene-targeting to replace exons 12–13 of *Foxp2* with a *Neomycin* selection cassette [26], yielding knockout mice (referred to here as *Foxp2*-KOs). Our homozygous mutants show overt similarities to the described *Foxp2*-KO homozygotes, including reduced weight-gain, delayed righting-reflex maturation, and postnatal lethality. However, Shu et al. reported abnormalities in cerebellar histoarchitecture in *Foxp2*-KO homozygotes at P15–17; PCs frequently failed to align in a monolayer, and there was

continued presence of an external granular layer (EGL) [26]. These observations might reflect an earlier state of cerebellar maturation associated with severe developmental delays. Detailed examination of our various homozygous mutants at P21 indicates a cerebellum with reduced volume but well-preserved histoarchitecture, including normal PC alignment and no persistent EGL (Figure 1D, Figure S4). Moreover, Shu and colleagues emphasized the complete absence of ultrasonic isolation calls made by *Foxp2*-KO homozygotes [26]. We similarly find no such calls in *Foxp2*-R552H homozygotes but demonstrate that these mice do produce complex structured ultrasounds in situations involving higher arousal (Figure 4) and suggest that their vocalization problems could be secondary to physical difficulties.

The heterozygous mutants of the present study also display notable differences from *Foxp2*-KO heterozygotes, which were reported to show moderate developmental delays and abnormal cerebellar histoarchitecture, including retainment of a one-cell-thick EGL at P17 [26]. Our heterozygotes, consistently across the allelic series, are viable and healthy, with normal postnatal weight gain, righting-reflex maturation, baseline motor skills, locomotor activity, and cerebellar size and morphology. In addition, although *Foxp2*-KO heterozygotes apparently display significantly reduced ultrasound production, with normal call properties [26], we find that *Foxp2*-R552H heterozygotes produce similar numbers of ultrasounds (whether USIs or USDs) as do wild-type littermates. Rates of ultrasound production follow characteristic strain-specific ontogenetic profiles, closely related to postnatal development [32]. Thus, the reduced USI production seen in *Foxp2*-KO heterozygotes, but not our *Foxp2*-R552H heterozygotes, might reflect the fact that only the former display developmental delays.

Overall, our data demonstrate the importance of considering arousal state, developmental delay, and physical well being when one is studying innately-specified vocalizations of mutant/knockout mice. Clearly, the relationship between *Foxp2* damage and vocalization changes is more complex than previously proposed [26].

Significance of *Foxp2*-R552H Mice

There is an emerging consensus that distributed circuits involving the cortex, basal ganglia, and cerebellum play key roles in mediating both motoric and cognitive function [33, 34]. With regard to *FOXP2* and speech and language disorders, it has been hypothesized that etiological mutations in this gene affect corticostriatal and corticocerebellar networks that facilitate the learning and production of rapid movement sequences [4] and that might also be important for aspects of language function [33]. Our study represents the first assessment of motor-skill learning and functional properties of relevant circuits in mice carrying *Foxp2* disruptions and focuses on a point mutation whose effects have been particularly well studied in humans. We find that *Foxp2*-R552H heterozygous mice display subtle but highly significant deficits in learning of rapid motor skills during species-typical behaviors. Moreover, we uncover abnormalities in synaptic plasticity in two key sites of conserved *Foxp2* expression with established links to motor-skill learning; striatal neurons and cerebellar PCs. These data are consistent with proposals that human speech faculties recruit evolutionarily ancient neural circuits involved in motor learning [33].

The complete lack of LTD in the dorsolateral striatum (putamen) of heterozygous *Foxp2*-R552H mice is intriguing, given that putamen underactivation was a major finding from functional neuroimaging of heterozygous *FOXP2*-R553H humans

Foxp2 in Synaptic Plasticity and Motor Learning

7

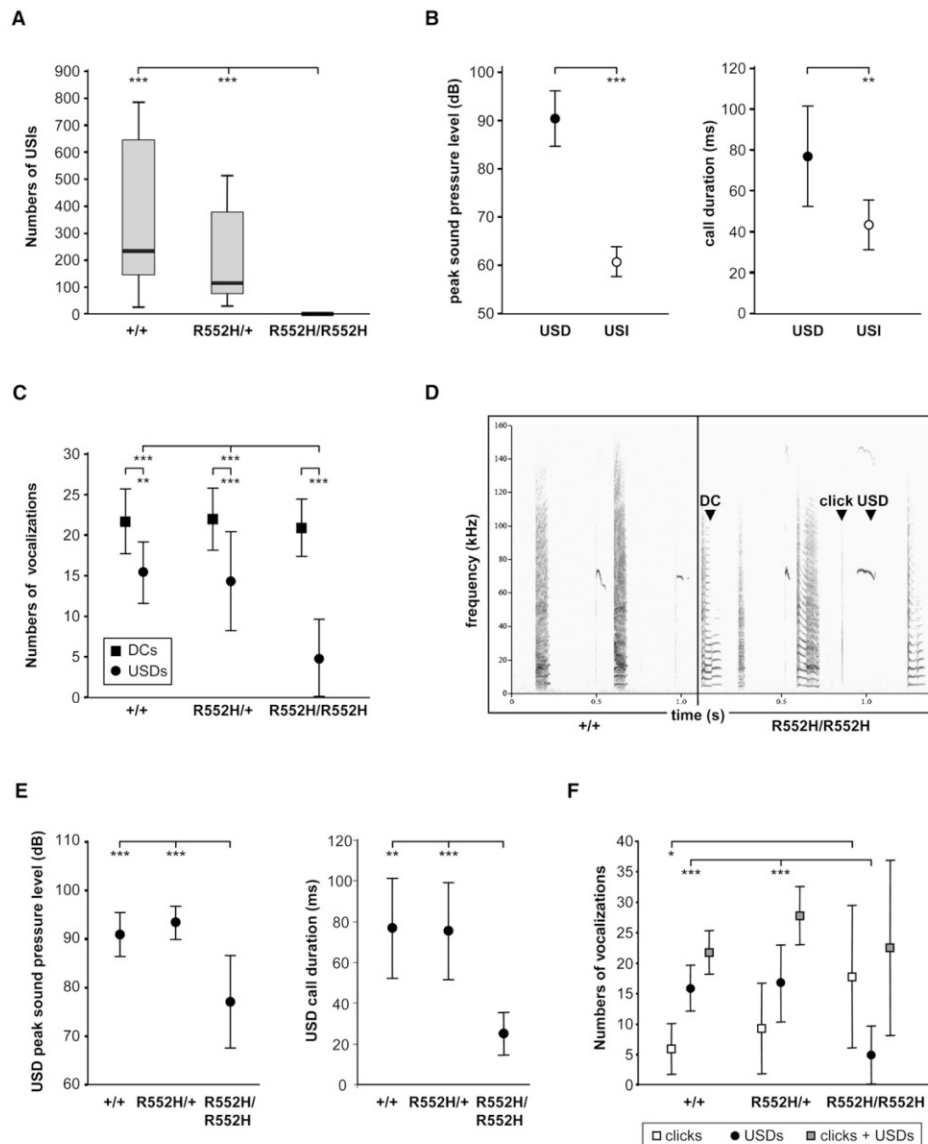


Figure 4. Vocalizations of Heterozygous and Homozygous R552H Pups

(A) Number of USIs produced during 15 min recording. Significant differences exist between wild-type ($n = 9$) and R552H homozygous ($n = 8$) and between heterozygous ($n = 10$) and homozygous mice (ANOVA on ranks, $p < 0.001$; U test, $p < 0.001$). There are no significant differences between wild-types and heterozygotes (U test, $p = 0.236$).

(B) Properties of USDs and USIs in wild-type mice. Peak sound pressure (left) differs between USDs and USIs in wild-types ($n = 9$; t test, $p < 0.001$). Call duration (right) differs between USDs and USIs in wild-types ($n = 8$ for USIs, $n = 9$ for USDs; t test, $p < 0.01$).

(C) Number of DCs and USDs in initial 10 s of recording. Number of DCs does not differ between groups (one-way ANOVA, $p > 0.05$). Homozygotes ($n = 8$) produce fewer USDs than do heterozygotes ($n = 16$) and wild-types ($n = 9$) (one-way ANOVA, $p < 0.001$; Tukey test, $p < 0.001$). All groups emit more DCs than USDs (t test, at least $p < 0.01$).

(D) Sample sonograms of DCs interspersed with USDs and clicks for wild-type and R552H homozygous pups.

(E) Peak sound pressure of USDs (left) in R552H homozygotes ($n = 7$) is significantly lower than heterozygotes ($n = 10$) and wild-types ($n = 9$) (one-way ANOVA, $p < 0.001$; Tukey test, $p < 0.001$). Call duration of USDs (right) is significantly reduced in homozygotes ($n = 5$) as compared to heterozygotes ($n = 16$) (Tukey test, $p < 0.001$) and wild-types ($n = 9$) (one-way ANOVA, $p < 0.001$; Tukey test, at least $p < 0.01$).

(F) Number of USDs and clicks in first 10 s of recording. R552H homozygotes ($n = 8$) emit significantly more clicks than do wild-types ($n = 8$) (one-way ANOVA, $p < 0.05$; Tukey test, $p < 0.05$) and heterozygotes ($n = 10$ for clicks and USDs, $n = 9$ for sum of clicks and USDs) (one-way ANOVA, $p < 0.001$; Tukey test, $p < 0.001$). The sum of clicks and USDs does not differ between groups (one-way ANOVA, $p > 0.05$).

In all panels, * indicates $p < 0.05$, ** indicates $p < 0.01$, and *** indicates $p < 0.001$. In (B), (C), (E), and (F), mean \pm standard deviation (SD) is shown.

[12]. Delineation of the precise *in vivo* mechanisms that yield this disturbed synaptic plasticity in mutant mice promises to shed important new light on our understanding of the disorder. Furthermore, our data support recent studies of songbird *FoxP2* that similarly indicate that the gene's effects on cognition and behavior go beyond development, to involve "online" roles in striatal neurons [35, 36]. Conditional mice in which *Foxp2* can be inactivated in a spatially and temporally selective manner [37] should allow separation of developmental and online functions. Such mice will also be essential for dissecting out relative contributions of striatal and cerebellar dysfunction to motor-skill learning deficits associated with *Foxp2* disruption.

Supplemental Data

Experimental Procedures, seven figures, and one table are available at <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/18/5/DC1>.

Acknowledgments

We wish to thank R. Hevner (Washington) for Tbr-1 antibodies and Amber Luo for technical assistance. This work was funded by grants from the Wellcome Trust to S.E.F., the British Heart Foundation to K.C., the Deutsche Forschungsgemeinschaft (EH53/19) to G.E., the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK 1097) to J.E. and M.G.B., and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) to J.E. J.P.d.B. is funded by the Bristol-Myers Squibb Cardiovascular Prize Fellowship. R.M.J.D. and D.A.K. were supported by a Wellcome Trust grant to the OXION group. S.P. is funded by the Max Planck Society, Germany. M.G. was supported by a Wellcome Trust Award. S.E.F. is a Royal Society Research Fellow.

Received: June 15, 2007

Revised: January 28, 2008

Accepted: January 29, 2008

Published online: March 6, 2008

References

- Lai, C.S., Fisher, S.E., Hurst, J.A., Vargha-Khadem, F., and Monaco, A.P. (2001). A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 413, 519–523.
- Watkins, K.E., Dronkers, N.F., and Vargha-Khadem, F. (2002). Behavioural analysis of an inherited speech and language disorder: comparison with acquired aphasia. *Brain* 125, 452–464.
- Fisher, S.E., and Marcus, G.F. (2006). The eloquent ape: genes, brains and the evolution of language. *Nat. Rev. Genet.* 7, 9–20.
- Vargha-Khadem, F., Gadian, D.G., Copp, A., and Mishkin, M. (2005). FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 131–138.
- Coghill, E.L., Huggill, A., Parkinson, N., Davison, C., Glenister, P., Clements, S., Hunter, J., Cox, R.D., and Brown, S.D. (2002). A gene-driven approach to the identification of ENU mutants in the mouse. *Nat. Genet.* 30, 255–256.
- Vernes, S.C., Nicod, J., Elahi, F.M., Coventry, J.A., Kenny, N., Coupe, A.M., Bird, L.E., Davies, K.E., and Fisher, S.E. (2006). Functional genetic analysis of mutations implicated in a human speech and language disorder. *Hum. Mol. Genet.* 15, 3154–3167.
- MacDermot, K.D., Bonora, E., Sykes, N., Coupe, A.M., Lai, C.S., Vernes, S.C., Vargha-Khadem, F., McKenzie, F., Smith, R.L., Monaco, A.P., and Fisher, S.E. (2005). Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 1074–1080.
- Shu, W., Lu, M.M., Zhang, Y., Tucker, P.W., Zhou, D., and Morrissey, E.E. (2007). Foxp2 and Foxp1 cooperatively regulate lung and esophagus development. *Development* 134, 1991–2000.
- Ferland, R.J., Cherry, T.J., Preware, P.O., Morrissey, E.E., and Walsh, C.A. (2003). Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J. Comp. Neurol.* 460, 266–279.
- Lai, C.S., Gerrelli, D., Monaco, A.P., Fisher, S.E., and Copp, A.J. (2003). FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. *Brain* 126, 2455–2462.
- Watkins, K.E., Vargha-Khadem, F., Ashburner, J., Passingham, R.E., Connelly, A., Friston, K.J., Frackowiak, R.S., Mishkin, M., and Gadian, D.G. (2002). MRI analysis of an inherited speech and language disorder: structural brain abnormalities. *Brain* 125, 465–478.
- Liegeois, F., Baldeweg, T., Connelly, A., Gadian, D.G., Mishkin, M., and Vargha-Khadem, F. (2003). Language fMRI abnormalities associated with FOXP2 gene mutation. *Nat. Neurosci.* 6, 1230–1237.
- De Bono, J.P., Adlam, D., Paterson, D.J., and Channon, K.M. (2006). Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R926–R934.
- Buitrago, M.M., Schulz, J.B., Dichgans, J., and Luft, A.R. (2004). Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81, 211–216.
- Middleton, F.A., and Strick, P.L. (2000). Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31, 236–250.
- Costa, R.M., Cohen, D., and Nicoletis, M.A. (2004). Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr. Biol.* 14, 1124–1134.
- Akita, H., Ogata, M., Jitsuki, S., Ogura, T., Oh-Nishi, A., Hoka, S., and Saji, M. (2006). Nigral injection of antisense oligonucleotides to synaptotagmin I using HVJ-liposome vectors causes disruption of dopamine release in the striatum and impaired skill learning. *Brain Res.* 1095, 178–189.
- Dang, M.T., Yokoi, F., Yin, H.H., Lovinger, D.M., Wang, Y., and Li, Y. (2006). Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 15254–15259.
- Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N.B., and Bernardi, G. (1992). Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J. Neurosci.* 12, 4224–4233.
- Lovinger, D.M., Tyler, E.C., and Merritt, A. (1993). Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *J. Neurophysiol.* 70, 1937–1949.
- Gerdeman, G.L., Ronesi, J., and Lovinger, D.M. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat. Neurosci.* 5, 446–451.
- Hashimoto, K., and Kano, M. (2005). Postnatal development and synapse elimination of climbing fiber to Purkinje cell projection in the cerebellum. *Neurosci. Res.* 53, 221–228.
- Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405.
- Malenka, R.C., Kocsis, J.D., Ransom, B.R., and Waxman, S.G. (1981). Modulation of parallel fiber excitability by postsynaptically mediated changes in extracellular potassium. *Science* 214, 339–341.
- Ito, M. (2002). The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 896–902.
- Shu, W., Cho, J.Y., Jiang, Y., Zhang, M., Weisz, D., Elder, G.A., Schmeidler, J., De Gasperi, R., Sosa, M.A., Rabidou, D., et al. (2005). Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 9643–9648.
- Roberts, L.H. (1975). The rodent ultrasound production mechanism. *Ultrasonics* 13, 83–88.
- Sanders, I., Weisz, D.J., Yang, B.Y., Fung, K., and Amirali, A. (2001). The mechanism of ultrasonic vocalization in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 27, 19.
- Haack, B.M.H., and Ehret, G. (1983). Sound communication between parents and offspring (Springfield, Illinois: C. C. Thomas).
- Bell, R.W. (1974). Ultrasounds in small rodents: arousal-produced and arousal-producing. *Dev. Psychobiol.* 7, 39–42.
- Ehret, G. (2005). Infant rodent ultrasounds—a gate to the understanding of sound communication. *Behav. Genet.* 35, 19–29.
- Branchi, I., Santucci, D., and Alleva, E. (2001). Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav. Brain Res.* 125, 49–56.
- Lieberman, P. (2002). On the nature and evolution of the neural bases of human language. *Am. J. Phys. Anthropol.* 119 (Suppl 35), 36–62.
- Graybiel, A.M. (2005). The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 638–644.
- Haesler, S., Rochefort, C., Licznarski, P., Georgi, B., Osten, P., and Scharff, C. (2007). Incomplete and inaccurate Vocal Imitation after Knockdown of FoxP2 in Songbird Basal Ganglia Nucleus Area X. *PLoS Biol.* 5, e321.

Foxp2 in Synaptic Plasticity and Motor Learning

9

36. Teramitsu, I., and White, S.A. (2006). FoxP2 regulation during undirected singing in adult songbirds. *J. Neurosci.* *26*, 7390–7394.
37. French, C.A., Groszer, M., Preece, C., Coupe, A.M., Rajewsky, K., and Fisher, S.E. (2007). Generation of mice with a conditional Foxp2 null allele. *Genesis* *45*, 440–446.
38. Matthews, J.N., Altman, D.G., Campbell, M.J., and Royston, P. (1990). Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* *300*, 230–235.
39. Hansel, C., de Jeu, M., Belmeguenai, A., Houtman, S.H., Buitendijk, G.H., Andreev, D., De Zeeuw, C.I., and Elgersma, Y. (2006). AlphaCaMKII is essential for cerebellar LTD and motor learning. *Neuron* *51*, 835–843.

8.2 Groszer et al. 2008, Ergänzende Daten

Supplemental Data

S1

Impaired Synaptic Plasticity and Motor Learning in Mice with a Point Mutation Implicated in Human Speech Deficits

Matthias Groszer, David A. Keays, Robert M.J. Deacon, Joseph P. de Bono, Shweta Prasad-Mulcare, Simone Gaub, Muriel G. Baum, Catherine A. French, Jérôme Nicod, Julie A. Coventry, Wolfgang Enard, Martin Fray, Steve D.M. Brown, Patrick M. Nolan, Svante Pääbo, Keith M. Channon, Rui M. Costa, Jens Eilers, Günter Ehret, J. Nicholas P. Rawlins, and Simon E. Fisher

Supplemental Experimental Procedures

Animals

Generation of *Foxp2* Mutant Mice

We used a gene-driven ENU-based screening approach to generate an allelic series for murine *Foxp2*. R552H and N549K mice were derived from a large scale ENU mutagenesis project at Medical Research Council Harwell laboratories (Oxfordshire), United Kingdom [S1]. ENU was injected in founder mice of a BALB/c genetic background. DNA from approximately 5,400 F1 offspring was obtained. The region encoding the forkhead domain of *Foxp2*, comprising exons 12, 13, and 14, was amplified in all samples by polymerase chain reaction (PCR) with the following primers: *Foxp2_12/13_F*: 5'-CCAGTGGTTTCTCACCAAATC-3', *Foxp2_12/13_R*: 5'-CAGGAGGACTTTGGCGTTAC-3', *Foxp2_14_F*: 5'-GCTCCTCTTGGCTCTTACCG-3', and *Foxp2_14_R*: 5'-TGTGAGCATGCCTTAGCTG-3'.

PCR conditions were as follows: 95°C for 15 min (1 cycle), 95°C for 30 s, 62°C for 30 s at -0.5°C/cycle, 72°C for 60 s (13 cycles), 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 60 s (29 cycles), and 72°C for 7 min (1 cycle). Amplified products were screened for mutations with the WAVE DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Cheshire, United Kingdom). DNA samples with abnormal elution profiles were amplified and sequenced. Identified mutations R552H and N549K were derived from two different ENU mutagenized founder males.

S321X mice were derived from commercial parallel archives of genomic DNA and frozen sperm from approximately 17,000 F1 offspring of male C3H mice treated with ENU at Ingenium Pharmaceuticals, Germany as described [S2].

ENU mutagenesis yields multiple mutations at random throughout the genome [S3]. Nevertheless, it is highly unlikely that the observed phenotypes are explained by ENU-induced mutations other than those in *Foxp2*. Prior to phenotypic characterization, we employed marker-assisted backcrossing as described [S4] to eradicate potential confounding mutations from the genomic background (see below). On the basis of microsatellite marker analyses, we estimate that the probability of finding more than one functional mutation in our backcrossed animals is 0.0404 for the R552H line and 0.0526 for S321X. Moreover, the different *Foxp2* alleles provided concordant phenotypic findings, even though they were isolated from two independent ENU archives [S1, S2], each line being derived from a separate founder male. Further support comes from allelic intercrosses, with R552H/S321X compound-heterozygotes showing identical phenotypes to those of pure R552H or S321X homozygotes, and there was phenotypic consistency across two alternative genomic backgrounds (C57BL/6J and C3H).

Marker-Assisted Backcrossing

F1 founder males were backcrossed into the C57BL/6J and C3H backgrounds. To accelerate introgression of the *Foxp2* mutant alleles, and to eliminate flanking heterozygous DNA, we conducted marker-assisted backcrossing. After each backcross, microsatellites with known polymorphic differences on chromosome 6 were amplified from genomic DNA. For backcross C3H, the following markers were employed: D6mit138, D6mit204, D6mit116, D6mit223, D6mit384, and D6mit243. For backcross C57BL/6J, the following markers were employed: D6mit138, D6mit166, D6mit83, D6mit1, D6mit264, D6mit204, D6mit159, D6mit223, D6mit245, and D6mit70. PCR reactions were conducted in a total volume of 10 µl (2 µl of 5 ng/µl DNA, 1 µl 10x PCR buffer, 1 µl dNTPs [8 mM], 0.6 µl MgCl₂ [25 mM], 1 µl primers [10 µM], 0.05 µl Taq gold, and 4.35 µl H₂O), under the following conditions: 95°C for 15 min (1 cycle), 95°C for 30 s, annealing temperature for 30 s, 72°C for 30 s (30 cycles), and 72°C for 5 min (1 cycle). Mice with the smallest heterozygous region carrying the mutation were selected for backcrossing.

Genotyping

R552H and N549K mice were genotyped by PCR and restriction digestion of genomic DNA. The following primers were used: *Foxp2-R552H* forward:

5'-GTTCTCTGGACATTTCAAC-3' and *Foxp2-R552H* reverse: 5'-TGTGAGCATGCCCTTAGCTG-3'. PCR conditions were as follows: 94°C for 1 min (1 cycle), 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 68°C for 1 min (35 cycles), and 72°C for 10 min (1 cycle). For R552H mice, the 603 bp PCR products were digested with HgaI yielding fragments of 372 bp and 231 bp in wild-type mice but remained undigested in R552H homozygous mutant mice. For N549K mice, the PCR products were digested with BsmI yielding fragments of 380 bp and 223 bp in wild-type mice but remained undigested in N549K homozygous mutant mice.

S321X mutant mice were genotyped by PCR of genomic DNA with the following primers: *Foxp2-S321X* forward: 5'-ATAGTATGGAAGACAACGGC ATC-3' and *Foxp2-S321X* reverse: 5'-GATGGGGTTAGTAATGTTCTCA-3'. PCR conditions were as follows: 95°C for 15 min (1 cycle), 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min (35 cycles), and 72°C for 10 min (1 cycle). The 468 bp PCR products were digested with AflIII, yielding fragments of 332 bp and 136 bp in S321X homozygous mutant mice; DNA of wild-type mice remained undigested.

Maintenance

Mice were maintained on a 12 hr light/dark cycle at a temperature of 22°C, 60%–70% humidity, with ad libitum food and water access. Cages were provided with cardboard tunnels and wood sticks for environmental enrichment. Experiments were performed in accordance with the United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act 1986.

Histology

Animals were perfused with ice-cold 4% paraformaldehyde, and brains were removed and processed according to standard procedures. Immunohistochemistry was performed on 5 µm Paraffin sections. After antigen retrieval, sections were incubated with calbindin-D28k (1:500, cat. # CB-38a, Swant, Bellinzona, Switzerland) and GABA-A receptor alpha6 (1:50, cat.# sc-7359, Santa Cruz, USA) antibodies. Tbr1 (rabbit, 1:2000, R. Hevner laboratory, Washington) immunohistochemistry was performed on 40 µm cryosections.

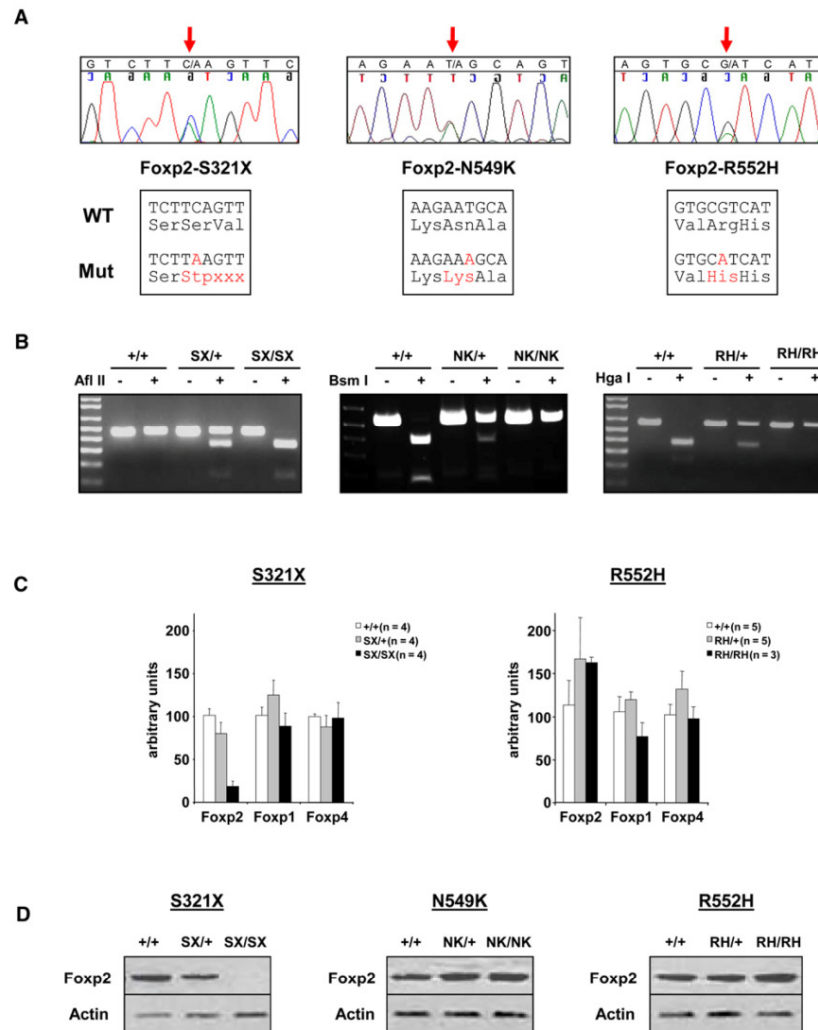
Analyses of Gene and Protein Expression

Western blotting and quantitative real-time reverse transcriptase (RT)-PCR were carried out as described previously [S5].

Striatal Electrophysiology

Brain slices from 3- to 6-month-old R552H heterozygous mice and wild-type littermates containing both striatum and cortex were prepared as described previously [S6]. Animals were anaesthetized with halothane and their brains extracted and transferred rapidly to artificial cerebrospinal fluid (aCSF), which was brought to pH 7.4 by aeration with 95% O₂ and 5% CO₂. Coronal sections (350 µm thick) were cut in ice-cold aCSF with a Vibrotome 1000 slicer (St. Louis, Missouri). Slices were transferred immediately to a nylon net submerged in normal aCSF containing 124 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, and 10 mM d-glucose. Normal aCSF was maintained at pH 7.4 by bubbling with 95% O₂ and 5% CO₂ at room temperature (19°C–22°C). After at least 1 hr of incubation at room temperature, hemislices were transferred to a recording chamber and submerged in aCSF. For all experiments, the temperature of the bath was maintained at 26°C–28°C stable within ± 1°C during any given experiment. Extracellular field recordings were obtained with micropipettes (2–4 MΩ) filled with 1 M NaCl solution. Test stimuli were delivered via a S45 stimulator (Grass Instruments, West Warwick, Rhode Island) at a frequency of 0.05 Hz through a bipolar twisted Teflon-coated tungsten wire placed in the dorsolateral striatum, and population spikes (PS) were recorded. Stimulus intensity was set to yield an evoked PS amplitude approximately half the size of the maximal evoked response. For the induction of long-term

S2

Figure S1. An Allelic Series of *Foxp2* Mutant Mice

(A) Sequence traces showing each heterozygous mutation with corresponding changes in coding sequence below.

(B) Identified mutations change the restriction digest pattern of genomic DNA. S321X introduces an *Afl*II restriction site, and N549K and R552H mutations abolish *Bsm*I and *Hga*I sites, respectively.

(C) Quantitative RT-PCR from E16 striatal precursor region, showing a significant reduction of *Foxp2* mRNA in S321X homozygotes (t test, WT versus S321X/S321X $p < 0.003$, WT versus S321X/+ $p = 0.19$, mean \pm SE). In R552H homozygotes, *Foxp2* mRNA levels are indistinguishable from wild-type littermates. Note that *Foxp2* deficiency does not appear to impact the expression of other *Foxp* family members, *Foxp1* and *Foxp4* in this region.

(D) Western-blot analysis of *Foxp2* protein expression in E16 whole cerebellum in *Foxp2* mutant strains, with antibodies recognizing the C terminus of the protein (Serotec). Equivalent results were also obtained when N-terminal antibodies (Santa Cruz) were used.

depression (LTD), four trains of high-frequency stimulation at 100 Hz for 1 s were delivered 10 s apart at the maximal evoked response. Data were filtered (high pass, 0.1 Hz; low pass 3 kHz) and then amplified and digitized with an Axoclamp 1D amplifier and Digidata 1322 interface (Axon Instruments and Molecular Devices, Sunnyvale, California). Input-output data and LTD data were analyzed with two-factor repeated-measures ANOVA, and post hoc unpaired test (PLSD) followed in the case of significant interaction. Stimulating strength necessary to evoke half of the maximum response was analyzed with unpaired t tests.

Cerebellar Electrophysiology

Preparation of Brain Slices

Acute cerebellar slices were obtained from 24- to 28-day-old C57BL/6J R552H heterozygous mice and wild-type littermates as described previously [S7]. The mice were decapitated under isoflurane anesthesia, the cerebellar vermis rapidly removed, and placed in ice-cold aCSF consisting of 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, and 20 mM glucose, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4 at room temperature). Parasagittal slices (200 μ m thick) were cut

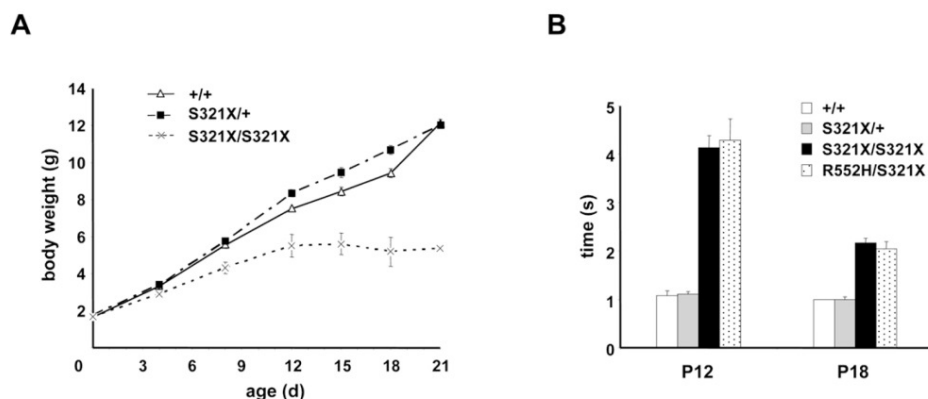


Figure S2. Postnatal Development of *Foxp2*-S321X Mutant Mice

(A) Time course of postnatal body weight development. Homozygous S321X mice ($n = 8$) show a strongly reduced weight gain. In contrast, S321X heterozygotes ($n = 16$) are indistinguishable from their wild-type littermates ($n = 9$) (mean \pm SEM). Removal of all S321X heterozygotes and wild-type littermates from the cage at postnatal day 4 does not improve weight gain or survival of S321X homozygotes. Therefore, their delays are not simply explained by difficulties in competing for milk and maternal care.

(B) Postnatal righting-reflex development. S321X ($n = 6$) homozygotes and R552H/S321X compound heterozygotes ($n = 6$) display a significantly delayed righting reflex. Heterozygous S321X ($n = 7$) mice are indistinguishable from their wild-type ($n = 4$) littermates (t test, WT versus S321X/+ $p = 0.9$, WT versus S321X/S321X $p < 0.001$).

with a vibratome (Microm HM 650 V, Wolldorf, Germany) and incubated in aCSF at 35°C for 30 to 45 min before they were stored at room temperature (20°C–22°C) until use. All recordings were performed at room temperature and in the presence of 10 μ M bicuculline-methiodide (Sigma).

Electrophysiological Recordings

Whole-cell recordings were obtained from the somata of visually identified Purkinje cells (PCs) with an EPC-10 patch-clamp amplifier (HEKA, Lambrrecht, Germany) controlled by Patchmaster software (HEKA). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass (Hilgenberg, Malsfeld, Germany) to reach 4–6 M Ω resistance when filled with the intracellular solution that contained 150 mM KClu, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, 3 mM Mg-ATP, 0.3 mM GTP, and 0.05 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) (pH 7.3, adjusted with HCl). Afferent climbing and parallel fibers (CFs and PFs, respectively) were stimulated with a glass pipette placed in the molecular and granular cell layer [S8]. CF inputs were identified by their typical paired-pulse depression and all-or-none characteristics [S8]. Stimulus-response curves of CF inputs and paired-pulse facilitation of PF responses were recorded in the voltage-clamp mode. To allow for a proper voltage clamp, we performed the former recordings in the presence of a submaximal concentration of the AMPA- (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) receptor blocker CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, 1–2 μ M) [S8] and with a series resistance compensation of 60%–70%. Imaging and LTD experiments were performed in the current-clamp:bridge mode. For LTD experiments, PF responses were evoked at 0.2 Hz. After a stable baseline of at least 5 min was obtained, LTD was induced by coactivation of CF and PFs at a frequency of 1 Hz for 5 min [S9]. Afterwards, PF stimulation was resumed at 0.2 Hz and LTD induction was monitored for 40 min.

Ca²⁺ Imaging

For analysis of CF-evoked Ca²⁺ transients in dendrites of PCs, EGTA in the intracellular solution was replaced by the Ca²⁺ indicator dye Oregon-Green 488 BAPTA-1 (OGB-1, 200 μ M). For confocal fluorescence recordings, PCs were dialyzed with the dye containing for 30–45 min before CF-evoked Ca²⁺ signals were recorded in the line-scan mode. Fluorescence signals were background corrected and divided by the baseline fluorescence to yield semiquantitative $\Delta F/F$ data. For analysis, the Ca²⁺ transients were fitted with a double exponential function with Igor Pro (Wavemetrics). The amplitudes and the temporal integrals of the Ca²⁺ transients were computed from the fits. Statistical tests were performed with Sigma Stat Software (RockWare).

Behavioral Studies

Righting

In the C57BL/6J strain, the first day of the mature righting response is expected to appear around postnatal day 11 [S10]. Righting was tested by

placement of a newborn mouse on its back and the time it took to turn over and place all four paws on the surface was measured. Each animal received four trials, and the mean time was taken.

Tilted Running Wheel

A detailed description of this system has been published recently [S11]. In brief, animals were provided in the home cage with an angled rotating running track (Lillico, Surry, United Kingdom), circumference 37.8 cm, mounted on a greased steel axle (Figure S7). The angled running track was used in preference to traditional vertical wheels so that larger diameter wheels could be used within cages. Wheel running was monitored with a magnetic reed switch attached to a computerized exercise-monitoring system [S11]. This system consisted of a micro 1401 (Cambridge Electronic Design [CED], Cambridge, United Kingdom) capable of simultaneously monitoring in real time the individual rotations of the wheel from up to 44 cages, with wheel rotations recorded and analyzed by computer with Spike 2 software (CED, Cambridge, United Kingdom). For each 24 hr period, the following parameters were recorded: time spent running, average speed of running, and the number and length of individual running bouts. A running bout was defined as episodes of continuous rotation of the wheel with no gaps of greater than 5 s.

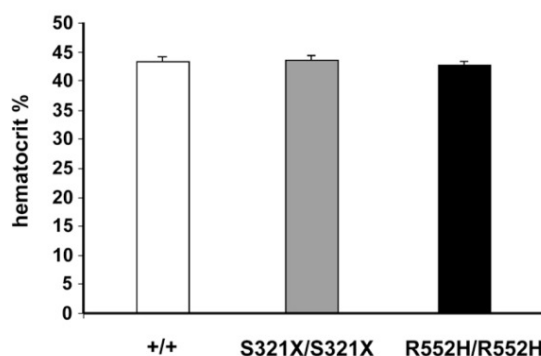


Figure S3. Hematocrit Measurements in *Foxp2* Mutant Mice

S321X and R552H homozygotes show no significant differences from wild-type littermates ($n = 3$ / group), (mean \pm SEM).

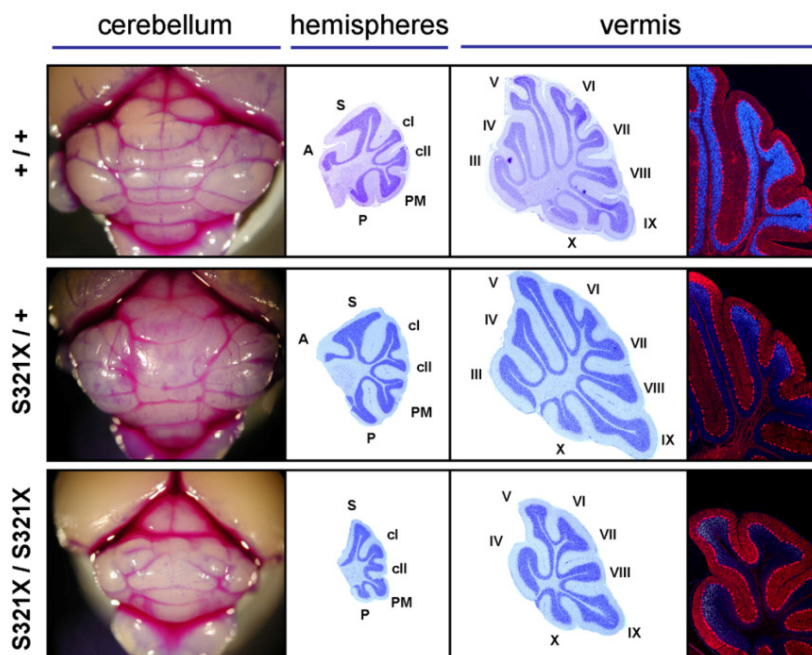


Figure S4. Cerebellar Development of *Foxp2*-S321X Mutant Mice

Cerebellar morphology at postnatal day 21 in wild-type (top row), heterozygous (middle), and homozygous S321X mice (bottom). Homozygotes display reduced cerebellar size (left-hand column) and foliation deficits in hemispheres and vermis (middle columns, cresyl violet staining). Nevertheless, Purkinje cells are aligned in a monolayer (right-hand column) as revealed by anti-calbindin immunohistochemistry (red) and DAPI nuclear staining (blue). Heterozygotes show no detectable alterations in cerebellar size, foliation, or layering. Vermis lobules are labeled III-X; hemispheric lobules are anterior (A), simplex (S), crus I (cl), crus II (cll), paramedian (PM), and pyramidis (P). All photographs were taken at same magnification. R552H/S321X compound heterozygotes show a similar cerebellar phenotype to the homozygotes, again involving reduced size/foliation but preserved architecture (data not shown).

Accelerating Rotarod

Mice were given four trials per day (1 hr intertrial interval) for three consecutive days. Rotarod studies were performed on an apparatus as described previously [S12]. Animals were matched for sex and litter and were between 6 and 8 weeks of age. Average weights (g \pm SD) for these animals were as follows: Males: wild-type (n = 5), 22.21 \pm 1.15; R552H heterozygotes (n = 5), 23.13 \pm 0.94 (p = 0.16), Females: wild-type (n = 5) 18.2 \pm 1.0; and R552H heterozygotes (n = 5): 17.5 \pm 1.4 (p = 0.4).

Open Field

This employed a brightly lit circular arena with a diameter of 60 cm. Mice were placed in the periphery of the open field and assessed for 5 min by a video camera mounted on the top of the open field. A Videotrack (version NT4.0) automated tracking system from Viewpoint (Champagne Au Mont D'or, France) was used for analysis of the video data.

Elevated Plus Maze

The elevated plus maze consisted of two opposing enclosed arms (30 \times 6 \times 21 cm), two opposite open arms (29.5 \times 6 \times 0.5 cm), and a central area (14.5 \times 14 cm). The apparatus was elevated 73 cm from the floor. Mice were placed in the center of the plus maze at the beginning of the test, and movements were monitored for 5 min with a mounted video camera. Video data were analyzed with the Videotrack system (Viewpoint).

Locomotor Activity

Basal locomotor activity was assessed with two independent systems: (1) With the San Diego Instruments Photoactivity system, which involves placement of each mouse individually in a plastic cage that has seven infrared beams crossing the width of the cage floor (46 cm \times 15 cm \times 21 cm). A thin layer of clean wood chips was placed in the cage, and the number of beam breaks measured in 5 min bins over a 30 min period. (2) In individual cages similar to the home cage, placed on load platforms of a Med Associates Threshold activity system. Each cage contained a measured volume of wood-chip bedding creating a layer approximately 0.5 cm thick; this

ensured equal foot force damping in all cages. Sessions lasted 1 hr, divided into 12 intervals (bins) of 5 min each. The lower threshold of the system was set to 20 V, and the parameter measured was the number of times this threshold was crossed.

T Maze Spontaneous Alternation

A mouse was placed in the start arm of a gray wooden T maze and allowed to choose one of the goal arms, in which it was confined for 30 s. It was then replaced in the start arm and allowed to make a second choice. An alternation was defined as the mouse's choosing the opposite arm to that entered on the previous, sample run. Mice were given one or two trials/day for a total of five trials each [S13].

Grooming

Mice were placed individually into gray wooden boxes (27 \times 9 \times 30 cm) with 1 cm of wood-chip bedding from the home cage on the floor. After a habituation period of 30 s, they were observed for 5 min. The number and total duration of grooming bouts was measured by an event counter and timer.

Vocalization Studies

So that the influence of the developmental delay in R552H homozygous mice on our vocalization studies could be reduced, newborn mice were studied at postnatal day 4, when peripheral thermoregulation is still immature in wild-type animals, and body weights were not significantly different between all groups (g \pm SD, WT: 2.66 \pm 0.52; R552H/+ : 2.73 \pm 0.48; and R552H/R552H: 2.23 \pm 0.49; t test: WT versus R552H/R552H, p = 0.12). Vocalizations were recorded in a soundproof and anechoic room with dim red light at an average temperature of 23 $^{\circ}$ C. For recording of isolation calls (USIs), a newborn was separated from its mother and placed in a dish (diameter: 14 cm, height: 4.5 cm). USIs were recorded for 15 min. For recording of distress calls, the tail was taken between thumb and index finger with gentle pressure and newborns lifted to elicit a minimum of ten audible distress calls (DCs) interspersed with ultrasounds (USDs). Recordings were performed with a calibrated condenser microphone (Bruel and Kjaer, Model 4135)

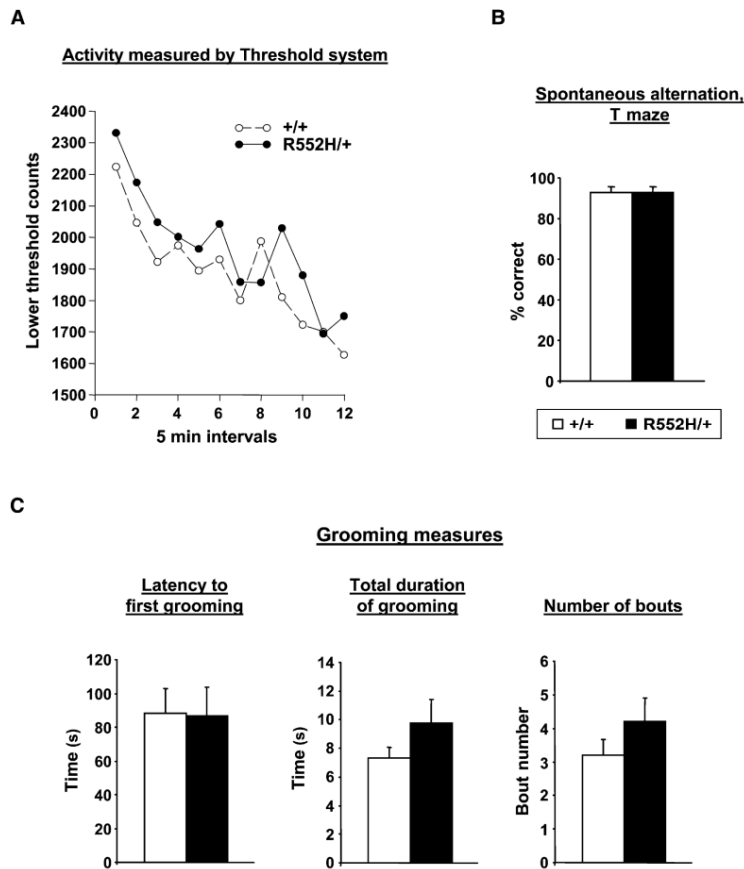


Figure S5. Behavior of *Foxp2-R552H* Heterozygous Mice

(A) Heterozygotes ($n = 17$) do not differ from wild-type littermates ($n = 17$) in spontaneous locomotor activity in a home-cage environment, assessed with a threshold activity system (Med Associates).

(B) R552H heterozygotes ($n = 17$) perform similarly to wild-type mice ($n = 17$) on tests of spontaneous alternation in the T maze (mean \pm SEM).

(C) R552H heterozygotes ($n = 10$) do not differ from wild-type littermates ($n = 10$) on measures of grooming (mean \pm SEM).

with preamplifier (Bruel and Kjaer, Model 2633) positioned about 8 cm above the mouse. The microphone output was high-pass filtered (Kemo VBF 10M, 132 dB/octave, 20 kHz high pass for USIs, 500 Hz high pass for

DCs and USDs). The output of the filter was amplified (Bruel and Kjaer measuring amplifier, Model 2636, 40 dB amplification for USIs and 70 dB amplification for USDs and DCs) and recorded (Toshiba notebook CPU, 500 kHz DAQCard-6062E National Instruments, SIGNAL software version 4.1) with a gain of 10.0 and a sampling rate of 357143 Hz.

For measurement of peak sound pressure level (SPL) of the newborn calls, a calibration measurement was performed. Synthesized calls were recorded as described above for DCs, USDs, and USIs, and their SPL in decibels shown on the display of the measuring amplifier was synchronously noted. The SPLs were 80 dB for the distress calls, 85 dB for USDs, and 60 dB for USIs. The corresponding voltages of the synthesized calls were noted, calculated in rms values, and served for comparison with the voltages of the sampled natural calls of newborns.

All behavioral studies were performed with the experimenter blind for the genotype.

Table S1. Behavior of *Foxp2-R552H* Heterozygous Mice Compared to Wild-Type Littermates

	Wild-Type (+/+)		Heterozygous (R552H/+)		p
	Mean \pm SEM	n	Mean \pm SEM	n	
Open Field					
Total activity (cm)	2704 \pm 166	8	2740 \pm 144	12	0.89
Centre time (s)	13.2 \pm 2.3	8	9 \pm 1.4	12	0.17
Elevated Plus Maze					
Open arm dist (cm)	119 \pm 23	9	106 \pm 59	11	0.85
Open arm entry (#)	4 \pm 0.6	9	3 \pm 1.01	11	0.44
Open arm time (s)	24 \pm 4.7	9	17 \pm 9.2	11	0.50
Open arm latency (s)	76 \pm 27.4	9	74.7 \pm 27.6	11	0.95
Activity (Photocell)					
Total ambulation	1224 \pm 80	9	1145 \pm 113	12	0.60
Fine movement	263 \pm 12.2	9	265 \pm 12	12	0.89

Heterozygous R552H mice and wild-type littermates show similar baseline anxiety (mean \pm SEM, t test) in open-field and elevated-plus-maze tests, both unconditioned tests of anxiety. In addition, there is no effect of genotype on spontaneous activity, assessed with a photoactivity system (San Diego Instruments).

Supplemental References

- Quwailid, M.M., Hugill, A., Dear, N., Vizor, L., Wells, S., Horner, E., Fuller, S., Weedon, J., McMath, H., Woodman, P., et al. (2004). A gene-driven ENU-based approach to generating an allelic series in any gene. *Mamm. Genome* 15, 585–591.
- Augustin, M., Sedlmeier, R., Peters, T., Huffstadt, U., Kochmann, E., Simon, D., Schoniger, M., Garke-Mayerthaler, S., Laufs, J., Mayhaus, M., et al. (2005). Efficient and fast targeted production of murine models based on ENU mutagenesis. *Mamm. Genome* 16, 405–413.
- Coghill, E.L., Hugill, A., Parkinson, N., Davison, C., Glenister, P., Clements, S., Hunter, J., Cox, R.D., and Brown, S.D. (2002). A gene-driven approach to the identification of ENU mutants in the mouse. *Nat. Genet.* 30, 255–256.

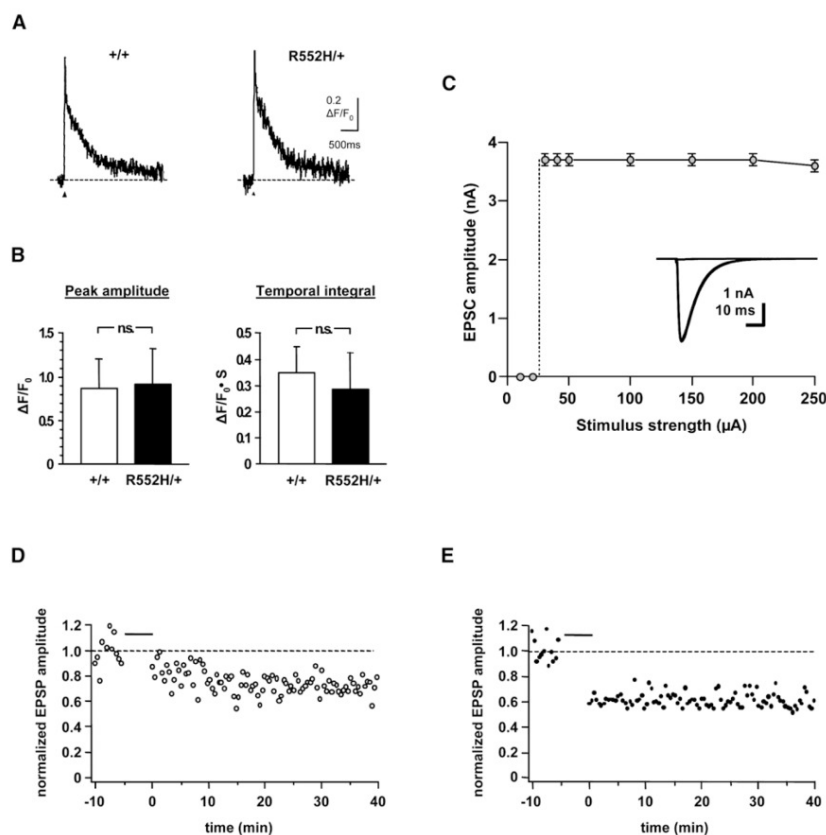


Figure S6. Cerebellar Electrophysiology in *Foxp2-R552H* Heterozygous Mice

(A) CF-evoked Ca^{2+} transients in distal dendrites (arrowhead: time point of stimulation). Representative traces from wild-type (left) and R552H heterozygous (right) mice.

(B) Summary data of the peak amplitude (left) and integral (right) of CF-evoked Ca^{2+} transients, indicating a grossly normal cerebellar synaptic circuitry in R552H heterozygotes (n.s. indicates not significant, mean \pm SD, $n = 5$ mice/group).

(C) EPSC amplitudes (mean \pm SD) evoked by stimulation of a CF in a PC from an R552H heterozygous mouse at increasing stimulus strength. The recording was performed in the presence of a submaximal concentration of the AMPA-receptor blocker CNQX. The dashed line represents the threshold at which EPSCs could be evoked. The inset shows the nine corresponding EPSCs superimposed (average of five responses at each stimulation strength). Stimulus artifacts were clipped for clarity. Note the all-or-none behavior of the responses, again consistent with undisturbed cerebellar synaptic circuitry.

(D) Example of LTD data in a PC from a wild-type mouse. Each data point represents the average of five synaptic responses. The black bar indicates the induction period (300 combined CF-PF stimulations at 1 Hz).

(E) Example of LTD data in a PC from an R552H heterozygous mouse. See Figure 3D in the main text for summary data and representative traces.

- S4. Keays, D.A., Clark, T.G., Campbell, T.G., Broxholme, J., and Valdar, W. (2007). Estimating the number of coding mutations in genotypic and phenotypic driven N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) screens: Revisited. *Mamm. Genome* 18, 123–124.
- S5. French, C.A., Groszer, M., Preece, C., Coupe, A.M., Rajewsky, K., and Fisher, S.E. (2007). Generation of mice with a conditional *Foxp2* null allele. *Genesis* 45, 440–446.
- S6. Gerdeman, G.L., Ronesi, J., and Lovinger, D.M. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat. Neurosci.* 5, 446–451.
- S7. Edwards, F.A., Konnerth, A., Sakmann, B., and Takahashi, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurons of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch.* 414, 600–612.
- S8. Konnerth, A., Llano, I., and Armstrong, C.M. (1990). Synaptic currents in cerebellar Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2662–2665.
- S9. Karachot, L., Kado, R.T., and Ito, M. (1994). Stimulus parameters for induction of long-term depression in in vitro rat Purkinje cells. *Neurosci. Res.* 21, 161–168.
- S10. Crusio, W.E., and Schmitt, A. (1998). A multivariate quantitative-genetic analysis of behavioral development in mice. *Dev. Psychobiol.* 32, 339–351.
- S11. De Bono, J.P., Adlam, D., Paterson, D.J., and Channon, K.M. (2006). Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R926–R934.
- S12. Guenther, K., Deacon, R.M., Perry, V.H., and Rawlins, J.N. (2001). Early behavioural changes in scrapie-affected mice and the influence of dapson. *Eur. J. Neurosci.* 14, 401–409.
- S13. Deacon, R.M., and Rawlins, J.N. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protocols* 1, 7–12.



Figure S7. Voluntary Running-Wheel System
Photograph of tilted running-track system used for home-cage assessments of voluntary motor-skill learning.

9 Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

10 Lebenslauf

Muriel Georgette Stoppe, geb. Baum

geboren am 11.10.1983 in Münster
verheiratet, ein Sohn

Studium

2002-2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig (Staatsexamen, Gesamtnote 2,0)
2010	Praktisches Jahr: Klinik für Endokrinologie, Universitätsklinikum Leipzig
2010	Praktisches Jahr: Klinik für Rheumatologie, Universitätsklinikum Leipzig
2009/2010	Praktisches Jahr: Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Leipzig
2009	Elternzeit
2008	Praktisches Jahr: Klinik und Poliklinik für Neurologie (Normalstation und Ambulanz), Universitätsklinikum Leipzig
2007	Famulatur: Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Leipzig
2007	Famulatur: Internistische Notaufnahme des Universitätsklinikum Leipzig

Wissenschaftliche Tätigkeit

2006-2011	Mitglied der Research Academy Leipzig der Universität Leipzig
2006-2011	Assoziiertes Mitglied des DFG-Graduiertenkollegs 1097 „InterNeuro“ der Universität Leipzig
2005-2011	Dissertation am Carl-Ludwig-Institut für Physiologie, Abt. Neurophysiologie, bei Prof. Dr. Eilers, Thema: Synaptische Plastizität im Kleinhirnkortex von FoxP2-mutanten Mäusen
2009	Studentische Hilfskraft für die Entwicklung des Masterstudiengangs Neurowissenschaften, Prof. Dr. Rübsamen, Institut für Biologie II, Universität Leipzig
März 2007	Laborbesuch bei Prof. Dr. Hanse, Universität Göteborg, Schweden
2006-2008	Studentische Hilfskraft am Carl-Ludwig-Institut, Prof. Dr. Eilers
2005/2006	Mitglied des DFG-Graduiertenkollegs 1097 „InterNeuro“
2005	Mitglied des Internationalen Promotionsprogramm der Universität Leipzig

Schullaufbahn

2000-2002	Ratsgymnasium Osnabrück (Allg. Hochschulreife, Gesamtnote 1,4)
1999/2000	Safford High School, Arizona, USA (High School Diploma mit Prädikat)
1994-1999	Marienschule Münster, Bischöfliches Mädchengymnasium
1992-1994	Gymnasium Paulinum
1989-1992	Johannisgrundschule Münster

Veröffentlichungen

2008	<i>Groszer M, Keays DA, Deacon RM, de Bono JP, Prasad-Mulcare S, Gaub S, Baum MG, French CA, Nicod J, Coventry JA, Enard W, Fray M, Brown SD, Nolan PM, Pääbo S, Channon KM, Costa RM, Eilers J, Ehret G, Rawlins JN, Fisher SE</i> <u>Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits</u> Curr. Biol. 2008 Mar 11;18:354-62
2008	<i>Baum MG, Eilers J</i> <u>Impaired synaptic plasticity in FoxP2 mutants</u> Poster, DFG-Berichtskolloquium, Graduiertenkolleg 1097 „InterNeuro“
2005	<i>Baum MG, Eilers J</i> <u>Synaptic stimulation paradigms: physiological patterns vs. Physiologists' patterns</u> Poster, Leipzig Research Festival, Posterpreis Bereich „Neurowissenschaften“

Stipendien/Förderprogramme

2004-2010	Stipendiatin der Studienstiftung für das Deutsche Volk
Juli 2007	Stipendiatin des 57. Nobelpreisträgertreffen in Lindau
2007	Förderprojekt MenCo (Mentoring und Coachingprogramm zur Berufseinstiegsförderung für angehende Ärztinnen/Ärzte in Sachsen)
Sept. 2006	Reisestipendium des Hansewissenschaftskollegs Delmenhorst zur 124. Versammlung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte
2005/2006	Förderprogramm ELISA (Eliteförderung Sachsen – Frauen in Naturwissenschaft, Technik und Medizin)

Auszeichnungen

2007	3. Platz Benjamin Franklin Contest 2007, gemeinsam mit vier weiteren Studierenden der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
2005	Posterpreis, Bereich „Neurowissenschaften“, Leipzig Research Festival

Mitgliedschaften

- seit 2006 Mitglied der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft
2006/2007 Gastmitgliedschaft der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte (GDNÄ)

Ehrenamtliche Tätigkeiten

- seit 2010 Organisation der Alumni des Leipziger Universitätsorchesters
seit 2009 Gründung und Stellvertretende Vorsitzende des Verein zur Förderung des Leipziger Universitätsorchesters e.V.
2003-2010 Konzertmeisterin des Leipziger Universitätsorchesters
2003-2006 Gründerin und Vorstandsmitglied des Leipziger Universitätsorchesters
2002/2003 Mitglied der Vorklinikkommission und des SturaMed Leipzig

Fremdsprachen

- Englisch fließend in Wort und Schrift
Französisch Grundkenntnisse

11 Danksagung

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Jens Eilers für das Anvertrauen des Themas, die Einführung in die Geheimnisse des Patch-Clamp und die umfassende Betreuung – nicht nur im rein wissenschaftlichen Bereich.

Dr. Matthias Groszer und Dr. Simon Fisher danke ich für die Bereitstellung der Mausmutanten und die erfolgreiche Kollaboration.

Mein herzlicher Dank geht an das DFG-Graduiertenkolleg 1097 „InterNeuro“. Im Rahmen dieses strukturierten Doktorandenprogramms konnte ich unter anderem durch zahlreiche Vorlesungen, Seminare, Praktika, Vorträge, Summer und Winter Schools sowie lange Abende im „Schreibers“ regelmäßig über den Tellerrand meines Promotionsthemas hinausschauen und damit einen breiten Einblick in die Neurowissenschaften erlangen.

Der Studienstiftung für das Deutsche Volk danke ich für die umfängliche Förderung meines Studiums und die finanzielle Unterstützung in der Endphase der Promotionsarbeit.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen für das angenehme Arbeitsklima, insbesondere bei: Christian für seine Bereitschaft, seine Erfahrungen als „Erstgeborener“ jederzeit zu teilen. Simone und Bernhard für die vielen interessanten wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche. Max für die unterhaltsame Lern-, Schreib- und Lange-Gespräche-Zeit im letzten dreiviertel Jahr. Robert für die kritischen Kommentare zur Arbeit. Vielen, vielen Dank an Gudrun Bethge für ihr kompetentes Labormanagement und die angenehme Zusammenarbeit.

Olli danke ich dafür, dass sich aus unserer Laborbekanntschaft eine jahrelange Freundschaft entwickelt hat, die über manchen Frustmoment im Laboralltag hinweggeholfen hat, aber auch mein Privatleben stetig bereichert.

Sebastian und Caspar danke ich für unsere glückliche gemeinsame Zeit.