

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Biologin Elena Stargardt
aus Hamburg

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 2013

Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Foxp1 während der Gehirnentwicklung

Gutachter

Prof. Dr. Gudrun Rappold

Institut für Humangenetik, Abteilung Molekulare Humangenetik

Prof. Dr. Werner Buselmaier

Institut für Humangenetik

Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts anzweifelt, prüft nichts. Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.

Teilhard de Chardin (1881-1955)

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig unter Anleitung verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den 24. Juli 2013

Elena Stargardt

Danksagung

Mit dieser Danksagung möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Gudrun Rappold danke ich für die Überlassung des Themas, für ihre wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Claire Bacon für ihre durchgehende Betreuung und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Henning Fröhlich danke ich für die fachliche Unterstützung, seine Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Vor allem Dr. Claudia Durand danke ich für ihre wissenschaftlichen Anregungen und ihre ständige Hilfsbereitschaft während und nach der gemeinsamen Zeit in der Arbeitsgruppe. Vielen Dank für das Korrekturlesen und für die fortwährende moralische Unterstützung.

Carolin Wohlfarth gilt ein besonderer Dank für ihre fachliche und moralische Unterstützung.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Rappold möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Maria Muciek, Dr. Li Li und Dr. Carsten Sticht (Zentrum für Medizinische Forschung, Universitätsklinikum Mannheim) danke ich für die Durchführung und Auswertung der Microarray-Experimente.

Für die kompetente Hilfe beim Lösen komplizierter LaTeX-Probleme bedanke ich mich oftmals bei Karl Henrik Heinonen.

Meiner Familie danke ich für die Ermöglichung des Studiums und der Promotion. Ich danke euch für eure großartige Unterstützung und den familiären Rückhalt.

Schließlich und keineswegs zuletzt danke ich meinem Mann Knut Stargardt für seine liebevolle Unterstützung und die entgegengebrachte Nachsicht.

Zusammenfassung

Das Gen *FOXP1* kodiert für ein Forkhead Box-Transkriptionsfaktor. Heterozygote Mutationen im *FOXP1*-Gen, die beim Menschen zu einer Haploinsuffizienz führen, rufen verschiedene kognitive Phänotypen hervor. Die Patienten leiden an geistiger Behinderung, einer Sprachentwicklungsstörung und in manchen Fällen an Autismus. Daher ist anzunehmen, dass *FOXP1* während der Gehirnentwicklung und bei kognitiven Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Jedoch ist bis heute wenig über die Rolle von *FOXP1* im Gehirn bekannt. Daher war die Zielsetzung dieser Arbeit, Zielgene von *Foxp1* während der embryonalen Gehirnentwicklung zu identifizieren und zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von zwei genomweiten Screening-Ansätzen potentielle Zielgene von *Foxp1* identifiziert. In einem ersten Ansatz wurde die Expression humaner SH-SY5Y Neuroblastomazellen mit und ohne *FOXP1*-Knockdown in Microarray-Studien verglichen. Aus diesem Screening ging *PCDH17* als Zielgen von *FOXP1* hervor. Die Aktivierung der Expression von *PCDH17* konnte zudem durch qPCR-Experimente in den murinen Neuroblastomazellen N1E-115 und in embryonalen Gehirnen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie bestätigt werden. Weitere qPCR-Studien zeigten, dass diese transkriptionelle Regulation von E13 bis E16 stattfindet. Am Entwicklungstag E16 war diese Aktivierung im Cortex, Striatum, Hippocampus und Thalamus zu beobachten. Eine direkte Bindung von *Foxp1* ca. 8 kb *upstream* vor dem Transkriptionsstart von *Pcdh17*, konnte in ChIP-Experimenten nachgewiesen werden.

Chrna4 wurde in einem weiteren Microarray-Screening, mit RNA von wt- und KO-Vorderhirnen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungstages E16, als Zielgen identifiziert. qPCR-Experimente bestätigten diese transkriptionelle Regulation am Entwicklungstag E15 und E16 im Vorderhirn von Mausembryonen. Zudem konnte diese Repression in Zellkultorexperimenten mit murinen N1E-115- und humanen SH-SY5Y-Zellen bestätigt werden. Weitere Studien mit RNA der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie zeigten, dass eine Repression von *Chrna4* durch *Foxp1* am Tag E16 im Thalamus stattfindet. Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten, dass *Chrna4* bei fehlender *Foxp1*-Expression auch in Neuronen exprimiert ist, in denen im wt-Gehirn *Foxp1*, aber nicht *Chrna4* exprimiert ist. Durchgeführte ChIP-Experimente zeigten, dass *Foxp1* direkt an den Promotor von *Chrna4* bindet.

Beide identifizierten Zielgene, *Pcdh17* und *Chrna4*, sind im embryonalen Gehirn in Arealen exprimiert, die in neuronale Kreisläufe involviert sind, welche für diverse kognitive Prozesse, wie beispielsweise der Sprachentwicklung, essentiell sind. *Pcdh17* ist ein Zelladhäsionsprotein und *Chrna4* kodiert für eine Untereinheit neuronaler Acetylcholinrezeptoren. Somit sind beide Proteine wichtig für die Signalübertragung am synaptischen Spalt. Aus veröffentlichten Studien ist bekannt, dass bei Patienten mit geistiger Behinderung und Autismus häufig Gene betroffen sind, die für synaptische Proteine kodieren. Somit ist es möglich, dass die Fehlregulationen von *PCDH17* und *CHRNA4*, in den Gehirnen von Patienten mit Mutationen im *FOXP1*-Gen, zu dem kognitiven Phänotyp beitragen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente identifizierten damit die ersten bekannten Zielgene von *Foxp1* im Gehirn und tragen zur Aufklärung der molekularen Rolle von *Foxp1* während der Gehirnentwicklung bei.

Abstract

The transcription factor Foxp1 is a member of the Fox gene family. Heterozygous mutations affecting the *FOXP1* gene, causing haploinsufficiency, lead to a broad cognitive phenotype. These patients suffer from intellectual disability, a significant impairment of speech and language abilities and autism spectrum disorder. This suggests an important role for FOXP1 in brain development and normal cognitive function. However, the role of FOXP1 in brain development remains to be investigated. To address this, the goal of my PhD thesis was to identify and analyse target genes of Foxp1 during brain development.

To uncover target genes of Foxp1 in brain development, whole genome microarray experiments were carried out. In a first approach, I compared gene expression in SH-SY5Y neuroblastoma cells with reduced *FOXP1* expression to cells with a normal level of *FOXP1* expression. This screening uncovered *PCDH17* as a potential target gene. To further validate this target, knockdown studies in the murine neuroblastoma cell line N1E-115 were carried out. In addition, forebrain RNA from E13, E15 and E16 embryos from a conditional *Foxp1*^{-/-} mouse were isolated and used for qPCR experiments. All experiments confirmed the transcriptional regulation of *Pcdh17* by Foxp1. At E16 this activation takes place in the hippocampus, thalamus, cortex and the striatum. A direct binding of Foxp1 about 8 kb upstream of the transcriptional start site of *Pcdh17* was demonstrated by ChIP experiments.

Chrna4 was identified as a target gene of Foxp1 in a microarray screen with RNA isolated from E16 forebrain of the conditional *Foxp1*^{-/-} mouse. Additional qPCR studies of E15 and E16 *Foxp1*^{-/-} forebrains confirmed this transcriptional repression of *Chrna4* by Foxp1. *In vitro* experiments in N1E-115 and SH-SY5Y cells affirmed the repression of *Chrna4* by Foxp1. Immunofluorescence studies showed that the expression of *Chrna4* is broader in the thalamus of E16 KO embryos. Moreover, this broader expression was observed in neurons expressing Foxp1, but not *Chrna4* in wt embryos. Further qPCR studies demonstrated a transcriptional repression of *Chrna4* by Foxp1 in the thalamus. ChIP experiments revealed a direct binding of Foxp1 4 kb upstream of the transcriptional start site of *Chrna4*.

The data show that *Pcdh17* and *Chrna4* are expressed in the embryonic brain during development. Both target genes are expressed in brain regions which are involved in neuronal circuits regulating diverse cognitive processes, including speech and language. *Pcdh17* is a cell adhesion molecule and *Chrna4* is an acetylcholine receptor subunit. Both proteins are important for the signal transduction at the synaptic cleft. Causative mutations leading to intellectual disability and autism spectrum disorder are often found in genes coding for synaptic proteins. Thus it is possible that the misregulation of *PCDH17* and *CHRNA4* in the brains of patients with a *FOXP1* haploinsufficiency may contribute to the cognitive phenotype.

This thesis has identified the first target genes of Foxp1 in the brain and *Pcdh17* and *Chrna4* may be useful candidates for understanding the role of Foxp1 in brain development.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	ii
Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
1.1 Transkription	7
1.1.1 Transkriptionskontrolle	8
1.2 Die <i>FOX</i> -Genfamilie	9
1.2.1 <i>FOXP</i> -Unterfamilie	11
1.2.2 Der Transkriptionsfaktor <i>FOXP2</i>	12
1.2.3 Der Transkriptionsfaktor <i>FOXP1</i>	13
1.3 Geistige Behinderung	15
1.4 Autismusspektrumstörung	16
1.5 Genetische Ursachen von Sprachstörungen	17
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material	19
2.1 Puffer, Medien und Lösungen	19
2.1.1 Selbst hergestellte Puffer, Medien und Lösungen	19
2.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur	23
2.2 Reagenzien und Kits	23
2.3 Oligonukleotide	25
2.4 Vektoren	27
2.5 Antikörper	27
2.6 Bakterienstämme	27
2.7 Datenbanken, Internetressourcen und Software	28
3 Methoden	29
3.1 DNA-basierte Methoden	29
3.1.1 Plasmidextraktion aus Bakterien	29

3.1.2	Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	29
3.1.3	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	30
3.1.4	Sequenzierung: Mega BACE	31
3.1.5	Klonierung	33
3.2	RNA-basierte Methoden	34
3.2.1	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben	34
3.2.2	cDNA-Synthese	34
3.2.3	Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)	35
3.2.4	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH)	36
3.2.5	Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip Array Technologie	38
3.3	Protein-basierte Methoden	38
3.3.1	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	38
3.3.2	Immunfluoreszenz-Färbungen (IF)	41
3.4	Zell-basierte Methoden	42
3.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	42
3.4.2	Transfektion	42
3.4.3	Luciferase-Reportergen-Assays	43
3.5	Tierexperimentelle Methoden	43
3.5.1	Tierhaltung und Versuchstiere	43
3.5.2	Genotypisierung der konditionellen <i>Foxp1</i> ^{-/-} -Mauslinie	44
3.5.3	Präparation von Embryonen und embryonalen Geweben	44
3.5.4	Anfertigung von Gefrierschnitten	45
3.6	Mikroskopie	45
3.6.1	Durchlichtmikroskopie	46
3.6.2	Epifluoreszenzmikroskopie	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Identifizierung und Validierung des Zielgens <i>PCDH17</i>	47
4.1.1	Microarray-Analyse mit humanen Neuroblastoma-Zellen	47
4.1.2	Bestätigung des potentiellen Zielgens <i>PCDH17</i>	49
4.1.3	Expression von <i>Foxp1</i> und <i>Pcdh17</i> während der embryonalen Gehirn- entwicklung	51
4.1.4	Expression von <i>FOXP1</i> und <i>PCDH17</i> im adulten humanen Gehirn	52
4.1.5	Etablierung der CHIP-Methode	53
4.1.6	Identifizierung von <i>Foxp1</i> Bindungsstellen in der Promotorregion von <i>Pcdh17</i>	55
4.1.7	Überprüfung der funktionellen Relevanz der Promotorregion „12“ von <i>Pcdh17</i>	56

4.2	Identifizierung und Validierung des Zielgens <i>Chrna4</i>	58
4.2.1	Microarray-Analyse mit RNA von Embryonen der <i>Foxp1</i> ^{-/-} -Mauslinie des Entwicklungsstadium E16	58
4.2.2	Bestätigung des potentiellen Zielgens <i>Chrna4</i>	59
4.2.3	Expression von <i>Foxp1</i> und <i>Chrna4</i> während der embryonalen Gehirn- entwicklung	61
4.2.4	Expression von <i>Foxp1</i> und <i>Chrna4</i> im Thalamus von wt und KO Em- bryonen	63
4.2.5	Expression von <i>FOXP1</i> und <i>CHRNA4</i> im adulten humanen Gehirn	65
4.2.6	Identifizierung von <i>Foxp1</i> -Bindungsstellen in der Promotorregion von <i>Chrna4</i>	65
4.2.7	Überprüfung der funktionellen Relevanz der Promotorregion „F“ von <i>Chrna4</i>	67
4.2.8	Biologische Prozesse, an denen <i>Chrna4</i> während der embryonalen Ge- hirnentwicklung beteiligt ist	68
5	Diskussion	70
5.1	Etablierung der ChIP-Methode mit endogenen Proteinen	71
5.2	Zielgen-Screening: <i>FOXP1</i> -Knockdown-Studien in SH-SY5Y Zellen	72
5.3	Zielgen-Screening: Vorderhirne der <i>Foxp1</i> ^{-/-} -Mauslinie des Entwicklungstages E16	77
	Literatur	84
	Anhang	98
5.3.1	ISH auf murinen Gehirnschnitten mit <i>Foxp1</i> und <i>Pcdh17</i> sense- und antisense-RNA-Sonden	98
5.3.2	Heatmaps biologischer Prozesse, an denen <i>Chrna4</i> beteiligt ist	99

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung von Kontrollelementen der Transkription.	9
1.2	Domänenstruktur der FOXA-, FOXO- und FOXP-Proteine.	10
1.3	Expression von <i>Foxp1</i> und <i>Foxp2</i> während der murinen Gehirnentwicklung. . .	13
1.4	Merkmale einer geistigen Behinderung.	15
4.1	Regulatorische Effekte von FOXP1 auf <i>PCDH17</i>	50
4.2	Expression von <i>Foxp1</i> und <i>Pcdh17</i> während der embryonalen Gehirnentwicklung.	52
4.3	Expression von <i>FOXP1</i> und <i>PCDH17</i> im adulten humanen Gehirn.	53
4.4	DNA-Fragmentgrößen der verwendeten sonifizierten DNA.	54
4.5	Anreicherung von TATA-Box DNA-Fragmenten der Pol II-ChIP.	55
4.6	Identifizierung von <i>Foxp1</i> -Bindungsstellen in der Promotorregion von <i>Pcdh17</i> .	56
4.7	Luciferase-Assays zur Analyse der funktionellen Relevanz der Promotorregion „12“ von <i>Pcdh17</i>	57
4.8	Regulatorische Effekte von <i>Foxp1</i> auf <i>Chrna4</i>	60
4.9	Expression von <i>Foxp1</i> und <i>Chrna4</i> im Thalamus während der embryonalen Gehirnentwicklung.	62
4.10	Expression von <i>Foxp1</i> und <i>Chrna4</i> im Thalamus von wt und KO Embryonen. .	64
4.11	Expression von <i>FOXP1</i> und <i>CHRNA4</i> im adulten humanen Gehirn.	65
4.12	Identifizierung von <i>Foxp1</i> -Bindungsstellen in der Promotorregion von <i>Chrna4</i> .	66
4.13	Luciferase-Assays zur Analyse der funktionellen Relevanz der Promotorregion „F“ von <i>Chrna4</i>	68
5.1	Schematische Darstellung des Zelladhäsionsproteins <i>Pcdh17</i> an der Synapse. .	74
5.2	Neuronale Prozesse, welche bei Patienten mit geistiger Behinderung gestört sein können.	75
5.3	Schematische Darstellung eines $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptors.	78
5.4	Schematische Darstellung der α -Synuclein-Foxp1-Chrna4-Hypothese.	82
5.5	ISH auf murinen Gehirnschnitten mit <i>Foxp1</i> und <i>Pcdh17</i> sense- und antisense- RNA-Sonden.	98
5.6	Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Zellkommunikation“.	99
5.7	Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Kationentransport“.	100
5.8	Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Synaptische Transmission“. .	101
5.9	Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Verhalten“.	102
5.10	Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Motorisches Verhalten“. . .	103

5.11 Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Transmission von Nervenimpulsen“	104
5.12 Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Metallionen“	105

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete PCR-Primer.	25
2.2	Primer für semiquantitative und quantitative PCRs.	26
2.3	siRNAs (Stealth Select RNAi siRNAs; Life Technologies).	26
2.4	Verwendete Vektoren.	27
2.5	Primärantikörper.	27
2.6	Sekundärantikörper.	27
4.1	Microarray-Ergebnisse des Zielgen-Screenings mit RNA von <i>FOXP1</i> Knockdown-Experimenten in den humanen Neuroblastoma-Zellen SH-SY5Y.	48
4.2	Microarray-Ergebnisse des Zielgen-Screenings mit RNA von Embryonen <i>Foxp1</i> ^{-/-} -Mauslinie des Entwicklungsstadiums E16.	59

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AChR	Acetylcholinrezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
ARF1	ADP-Ribosylierungsfaktor 1
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	„complementary“ DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
CGH-Array	„Comparative genomic hybridization array“
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
Chrna4	Neuronaler Acetylcholinrezeptor, Untereinheit Alpha-4
CNTNAP2	Contactin-associated protein-like 2
Cre	„causes recombination“
cRNA	„complementary“ RNA
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Embryonalstadium bei der Maus
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
FOX	Forkhead Box
FOXP1	Forkhead Box P1
FOXP2	Forkhead Box P2
g	je nach Kontext: Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histon-Deacetylase
hnRNA	prä-mRNA
IF	Immunfluoreszenz
FDR	„false discovery rate“
IP	Immunpräzipitation
IQ	Intelligenzquotient
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung

kb	Kilobasenpaar
KD	„knockdown“
-/- bzw. KO	„knockout“
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
µmol	Micromol
min	Minute
miRNA	microRNAs
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	„messenger“ RNA (Boten-RNA)
nM	Nanomolar
NES	Kernexportsignal
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCDH17	Protocadherin 17
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii (negativer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PITX3	Pituitary Homeobox 3
Pol II	Polymerase II
qPCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription bzw. Raumtemperatur
sec	Sekunde
siRNA	„small interfering“ RNA (kurze doppelsträngige RNA-Stücke)
SNP	„single nucleotide polymorphism“ (Einzelbasenaustausch)
snRNA	„small nuclear“ RNA
TF	Transkriptionsfaktor
tRNA	„transfer“ RNA
UTR	untranslatierte Region (eines Gens)

UV	ultraviolett
V	Volt
vs.	„versus“, gegenüber gestellt
wt	Wildtyp

1

Einleitung

1.1 Transkription

Die Regulation biologischer Prozesse erfordert eine genaue koordinierte Expression eukaryotischer Gene. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Transkription. Von welcher Bedeutung die Transkription ist, wird deutlich, wenn Mutationen oder strukturelle Chromosomen-Abberationen in regulatorische Sequenzen in Genen, die für Transkriptionsfaktoren oder Koregulatoren kodieren, auftreten. Führen diese zu gestörten transkriptionellen Abläufen und somit zu einer veränderten Expression, kann dies Krankheiten wie Krebs, Herzfehler und Entwicklungsstörungen zur Folge haben (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2001; Lettice *et al.*, 2003; Emison *et al.*, 2005; Rahimov *et al.*, 2008; Burwinkel *et al.*, 2006; Zanke *et al.*, 2007; Kathiresan *et al.*, 2009; Fenton *et al.*, 2006).

Während der Transkription wird DNA durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen in RNA umgeschrieben. In eukaryotischen Zellen gibt es drei Klassen von DNA-abhängige RNA-Polymerasen. Die Polymerase I wird bei der Synthese ribosomaler RNA (rRNA) benötigt. Für die Synthese von messenger RNA (mRNA) wird von der Polymerase II zunächst prä-mRNA (hnRNA) synthetisiert. Aus diesem Transkript werden während der Reifung die nicht-kodierenden Introns herausgespleißt und die 5'- und 3'-Ende werden modifiziert. Des Weiteren katalysiert die Polymerase II die Synthese einer Vorstufe von small nuclear RNAs (snRNA). Durch die Polymerase III werden transfer-RNAs (tRNA), die 5S rRNA und einige snRNAs synthetisiert (Strachan und Read, 1996).

Zu Beginn der Transkription binden basale Transkriptionsfaktoren und zusätzliche Faktoren (*trans*-aktive Faktoren) an regulatorische Elemente (*cis*-aktive Elemente) und rekrutieren somit die Polymerase II zum Transkriptionsstart. Durch Phosphorylierung der Polymerase wird

diese aktiviert und liest die DNA in 5' - 3'-Richtung ab. Durch Anlagerung der Nukleotide ATP, CTP, GTP und UTP wird das entstehende RNA-Transkript bis zum Erreichen der Polyadenylierungssequenz elongiert (typische Sequenz: AATAA). Hierdurch kommt es zum Abbruch der Transkription. Im weiteren Verlauf wird diese Sequenz abgespalten (3'-Ende). Bereits während der Elongation des Transkriptes wird am 5'-Ende ein 7-Methylguanosintriphosphat über eine Ester-Bindung (Capping) verbunden (Strachan und Read, 1996).

1.1.1 Transkriptionskontrolle

Cis-aktive Elemente sind Kontrollelemente der Transkription wie Promotoren, Enhancer und Silencer. Promotoren sind weit verbreitete Kontrollelemente, die proximal oder distal vom Transkriptionsstart liegen. Das wohl bekannteste Kontrollelement der proximalen Promotoren ist die TATA-Box. Ungefähr 50 % aller menschlichen Gene werden durch dieses Kontrollelement reguliert (Lee und Young, 2013; Sandelin *et al.*, 2007).

Es gibt ca. 1400 Transkriptionsfaktoren, die Transkriptionsfaktor-spezifische Sequenzen erkennen und binden, und so die Transkription bestimmter Gene regulieren (Lander *et al.*, 2001; Vaquerizas *et al.*, 2009; Venter *et al.*, 2001). Bei der Transkription eines Genes binden 200-300 Transkriptionsfaktoren an proximale Promotoren. Diese bilden zusammen mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und anderen Kofaktoren die basale Transkriptionsmaschinerie. Für die Transkription der meisten für Proteine kodierenden Gene wird diese Transkriptionsmaschinerie benötigt. Zudem wird die Transkription durch distale Promotoren kontrolliert. Die distalen Promotoren können *upstream* oder *downstream* des zu regulierenden Gens liegen. Sind die distalen Kontrollelemente weit vom Transkriptionsstart entfernt, können gebundene Proteine durch Schleifenbildung des Chromatins (looping) mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren. Über diesen looping-Mechanismus kommt es auch zu Enhancer-Promotor-Interaktionen (Maston *et al.*, 2006) (Abb. 1.1). Enhancer (Transkriptionsverstärker) sind Kontrollelemente, welche wie Promotoren Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten, aber weit vom Transkriptionsstart entfernt liegen. Koaktivatoren, wie die Histoneacetyltransferase p300, interagieren mit den Transkriptionsfaktoren und beeinflussen somit die Anlagerung der Transkriptionsfaktoren an den Promotor und aktivieren die Transkription (Visel *et al.*, 2009). Wie auch Enhancer gehören Silencer zu den *cis*-regulatorischen Elementen und enthalten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Jedoch setzen diese die Transkriptionsaktivität herab. Enhancer und Silencer liegen oft weit vom Transkriptionsstart entfernt und kommunizieren mit dem Promotor über einen looping-Mechanismus. Die Repression der Transkription wird entweder durch die Blockierung der Bindung von Aktivatoren an Enhancer, durch das Konkurrieren von Enhancern und Silencern um Transkriptionsfaktoren oder durch die Rekrutierung von Proteinen, die das Histon modifizieren, erreicht (Zhao und Dean, 2005; Maston *et al.*, 2006). Auch die Packungsdichte der DNA beeinflusst die

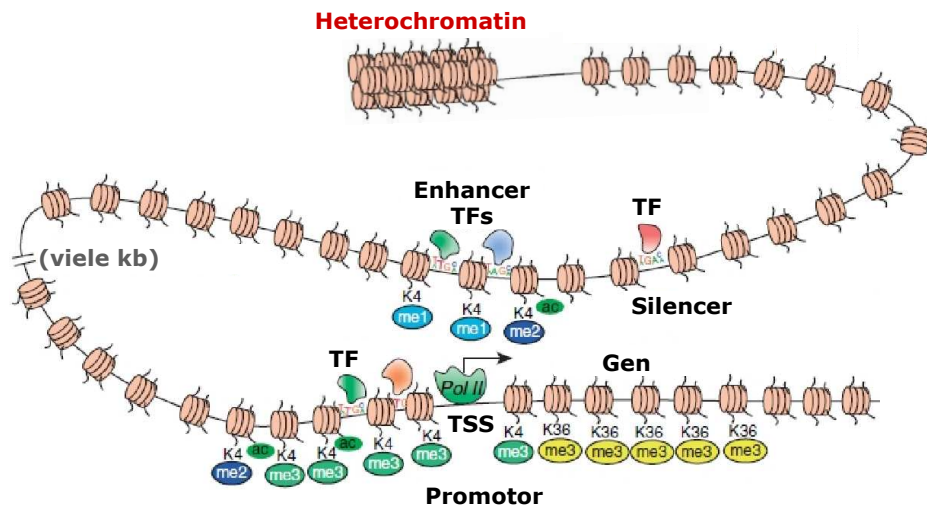


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von Kontrollelementen der Transkription. Der Promotor wird von dem distal gelegenen Enhancer aktiviert. Der nahe gelegene Silencer konkurriert mit dem Enhancer um die an den Enhancer gebundene Transkriptionsfaktoren (TF) und/ oder Aktivatoren und reguliert somit die Aktivität des Enhancers. Einige repräsentative Histonmodifikatoren sind gezeigt. Grüne und blaue Ovale: aktivierende Faktoren; gelbe Ovale: reprimierende Faktoren. TSS: „transcription start site“ (Transkriptionsstart). Modifiziert nach Sakabe und Nobrega (2010).

Transkription. In eukaryotischen Zellen ist ein Großteil der DNA um Histone gewickelt. Im Heterochromatin sind jeweils 146 bp DNA um Histonoktamere (H2A, H2B, H3 und H4) gewickelt. Diese Einheit wird als Nukleosom bezeichnet. Durch die Rekrutierung von Nukleosom Remodelierungsenzymen wird die dichte Packung der DNA während der Transkription aufgelockert (Euchromatin). Diese modifizieren die Histone chemisch, wodurch es zur Veränderung der Chromatinstruktur kommt. So kann beispielsweise die Transkription durch Acetylierung (H2A, H2B, H3, H4) oder Methylierung (H3) der N-terminalen Aminosäuren der Histone reguliert werden. Diese chemischen Modifikationen werden durch Histon-Deacetylasen und -Methylasen katalysiert (Barrera und Ren, 2006).

1.2 Die *FOX*-Genfamilie

Die Gene der *Forkhead Box*-Genfamilie (*FOX*) kodieren für Transkriptionsfaktoren, die alle eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne, die Forkhead-Domäne, enthalten. Seit der

Entdeckung der ersten *FOX*-Gene in *Drosophila melanogaster* wurden mehr als 170 *FOX*-Gene in 14 Spezies von der Hefe bis zum Mensch identifiziert (Weigel und Jäckle, 1990). Im Menschen sind mehr als 40 *FOX*-Gene bekannt. Aufgrund der Sequenzkonservierung der Forkhead-Domäne gibt es eine Einteilung der *FOX*-Gene in 19 Unterfamilien (von *FOXA* bis *FOXN*) (Tuteja und Kaestner, 2007a,b). Die Forkhead-Domäne hat ein Schmetterlings-ähnliches Aussehen und wird daher auch als Winged-Helix-Domäne bezeichnet (Clark *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu Winged-Helix-Proteinen, binden FOX-Proteine die DNA jedoch als Monomere. Eine Ausnahme stellt die Unterfamilie *FOXP* dar. Mit Hilfe der Zink-Finger- und Leucin-Zipper-Domänen bilden die *FOXP*-Proteine Homo- oder Heterodimere (Shu *et al.*, 2001) (Abb. 1.2). Diese Domänen führen zu einer Erweiterung der Vielfalt der Funktionen und Regulationen. Auch durch Interaktion mit Sequenzen außerhalb der Forkhead-Domäne oder mit anderen Faktoren wird ein weites Spektrum an Regulation in der *FOX*-Genfamilie erreicht. FOX-Proteine können die Expression der Zielgene sowohl aktivieren als auch reprimieren. Dies wird durch die Rekrutierung von Kofaktoren oder Repressoren, wie zum Beispiel

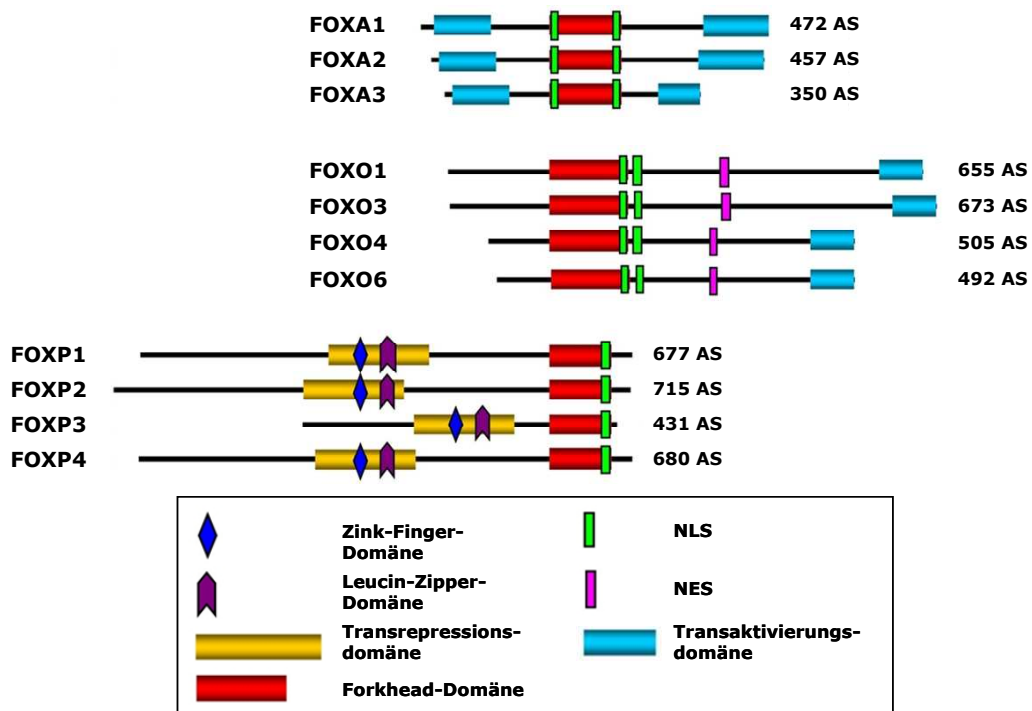


Abbildung 1.2: Domänenstruktur der FOXA-, FOXO- und FOXP-Proteine. Die Forkhead-Domäne (rot), die Transrepressionsdomäne (gelb) und die Transaktivierungsdomäne (hellblau) sind regulatorische Sequenzen, welche für die Regulation der Expression von Zielgenen wichtig sind. Das Kernlokalisierungssignal (NLS: grün) und mögliche Kernexportsignale (NES: pink) der FOX-Proteine, sowie mögliche Zink-Finger- (dunkelblau) oder Leucin-Zipper-Domänen (lila) sind im Schema dargestellt. Modifiziert nach Lalmansingh *et al.* (2012).

Histon-Deacetylasen erreicht. Die Aktivität und die Lokalisierung in der Zelle wird bei den FOX-Proteinen durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitylierung beeinflusst (Yang *et al.*, 2005; van der Horst *et al.*, 2006). Eine Phosphorylierung der FOXO-Proteine führt zu einem Export aus dem Zellkern, wohingegen phosphorylierte FOXM-Proteine importiert werden. Durch diese posttranslationale Modifikation wird über die Lokalisierung die Aktivität bestimmt, denn nur im Zellkern lokalisierte FOX-Proteine fungieren als Transkriptionsfaktoren. Ein Export in das Cytoplasma führt zu einer Deaktivierung und oft werden die Proteine durch Proteosomen abgebaut (Brunet *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2010).

1.2.1 FOXP-Unterfamilie

Die vier Proteine der FOXP-Unterfamilie (FOXP1-4) sind gekennzeichnet durch zusätzliche Zink-Finger- und Leucin-Zipper-Domänen am N-Terminus (Shu *et al.*, 2001) (Abb. 1.2). Bei den meisten Proteinen der FOX-Familie ist die Forkhead-Domäne am N-Terminus gelegen. Ein weiteres Merkmal der FOXP-Unterfamilie ist die atypisch lokalisierte Forkhead-Domäne am C-Terminus. Identifiziert wurden *Foxp1*, *Foxp2* und *Foxp4* bei einem Screening nach weiteren Forkhead-Genen in der murinen Lunge (Shu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002). Die Existenz von *FOXP3* wurde aufgedeckt, da Mutationen in diesem Gen in Mäusen und Menschen mit lymphoproliferativen Erkrankungen gefunden wurden (Brunkow *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2001; Wildin *et al.*, 2001).

In einer Vielzahl von Experimenten wurde die Expression der *Foxp1*-Unterfamilie untersucht. *Foxp1*, *Foxp2* und *Foxp4* werden im murinen Gehirn exprimiert, *Foxp3* hingegen nicht. Letzteres ist ausschließlich im Immunsystem exprimiert (Brunkow *et al.*, 2001). Außer im Gehirn werden *Foxp1*, *Foxp2* und *Foxp4* auch in anderen Organen, wie der Lunge, dem Herzen und dem Darm exprimiert. Die Expression der Zielgene der FOXP-Transkriptionsfaktoren wird in diesen Organen vorwiegend reprimiert. Es gibt Hinweise, dass in wenigen Fällen die FOXP-Proteine auch indirekt als Aktivatoren wirken können (Wu *et al.*, 2006; Konopka *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2007). Der Mechanismus der transkriptionellen Repremierung durch FOXP-Transkriptionsfaktoren wurde bereits entschlüsselt. So wird die Repression der Zielgene durch die Rekrutierung bestimmter Chromatin-modifizierender Enzymkomplexe erreicht. Diese werden von der Zink-Finger- und Leucin-Zipper-Domäne rekrutiert. Die hoch konservierten Domänen sind somit für die Dimerisierung und die Repression von Bedeutung. Des Weiteren wird angenommen, dass beide Funktionen zusammenhängen. Die Dimerisierung der FOXP-Transkriptionsfaktoren führt zu einer veränderten Chromatinstruktur, welche sich günstig auf die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Proteinen auswirkt (Shu *et al.*, 2001; Chae *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007, 2004; Wang *et al.*, 2003). Eine wichtige Rolle spielen hierbei Histon-Deacetylasen (HDACs). Durch die Rekrutierung der HDACs entfernen diese

Acetylreste von acetyliertem Lysin der N-terminalen Enden der Histone. Hierdurch kommt es zur Verdichtung des Chromatins. Denn durch die Deacetylierung des Lysins erhält dieses eine positive Ladung und somit eine höhere Affinität zu dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Somit verhindert bzw. verschlechtert die erhöhte Packungsdichte des Chromatins das Binden der Transkriptionsmaschinerie an den Promotor (Li *et al.*, 2004; Jepsen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007).

1.2.2 Der Transkriptionsfaktor FOXP2

FOXP2 ist der bekannteste FOXP-Transkriptionsfaktor. Bereits vor über zehn Jahren wurde über den Drei-Generationen-Stammbaum der sogenannten KE-Familie berichtet. Die Hälfte der Mitglieder dieser Familie leidet unter einer Spachentwicklungsstörung, der verbalen Entwicklungsdyspraxie (engl.: developmental verbal dyspraxia) (Hurst *et al.*, 1990). Eine genomweite Untersuchung zeigte, dass alle betroffenen Familienmitglieder eine heterozygote Missense-Punktmutation im *FOXP2*-Gen tragen. Diese Mutation wird in der KE-Familie autosomal dominant vererbt und führt zu einem Arginin zu Histidin Austausch der Aminosäure 553 (R553H) in der Forkhead-Domäne des *FOXP2*-Gens (Fisher *et al.*, 1998). In einer anderen Familie wurde eine weitere Punktmutation (R328X) identifiziert. Wie bei der KE-Familie leiden die betroffenen Familienmitglieder an verbaler Entwicklungsdyspraxie. Diese Nonsense-Punktmutation führt zu einem verfrühten Stoppcodon. Daher ist es wahrscheinlich, dass diese stark verkürzten Transkripte durch „nonsense-mediated mRNA decay“ abgebaut werden und dies zu einer Haploinsuffizienz von *FOXP2* führt (MacDermot *et al.*, 2005). Zudem sind mehrere Translokationen und Deletionen bekannt, die zur Zerstörung des *FOXP2*-Gens und damit zur verbalen Entwicklungsdyspraxie führen (Lai *et al.*, 2001; Zilina *et al.*, 2012; Zeeman *et al.*, 2006). Obwohl nur ca. 2 % der Patienten mit einer verbalen Entwicklungsdyspraxie Mutationen im *FOXP2*-Gen tragen, ist die Entdeckung der ätiologischen *FOXP2*-Mutationen ein wichtiger Schritt bei der Erforschung der Sprachentwicklung des Menschen (MacDermot *et al.*, 2005; Fisher, 2007).

Für die Identifizierung der molekularen Mechanismen, welche von *Foxp2* im Gehirn reguliert werden, wurden in verschiedenen Studien Zielgene und Signalwege aufgedeckt. Es konnte gezeigt werden, dass *Foxp2* die Expression des Neurexins „*Contactin-associated protein-like 2*“ (*CNTNAP2*) direkt reguliert. Bei Kindern mit expressiven und rezeptiven Sprachdefiziten (ohne Einschränkungen der Intelligenz) konnten „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) in Introns des *CNTNAP2*-Gens mit Defiziten des Wiederholens von Nonsense-Wörtern assoziiert werden (Vernes *et al.*, 2008). Zudem konnte von Vernes *et al.* einen direkten und indirekten Einfluss von *Foxp2* auf die Regulation der Länge und Verzweigung von Neuriten (Zellfortsätze von Neuronen) zeigen. Somit stellt *Foxp2* während der Entwicklung des Nervensystems einen wichtigen Regulator der neuronalen Netzwerke dar (Vernes *et al.*, 2011).

1.2.3 Der Transkriptionsfaktor FOXP1

Foxp1 und *Foxp2* wurden in der Lunge als transkriptionelle Repressoren identifiziert. Beide Transkriptionsfaktoren werden zudem während der Entwicklung im Darm, im Herzen und im Gehirn exprimiert (Shu *et al.*, 2001). *Foxp1* und *Foxp2* sind während der Gehirnentwicklung und im adulten Gehirn im Cortex und Hippocampus differentiell und im Striatum und Thalamus überlappend exprimiert (Abb. 1.3) (Ferland *et al.*, 2003). Die Koexpression von

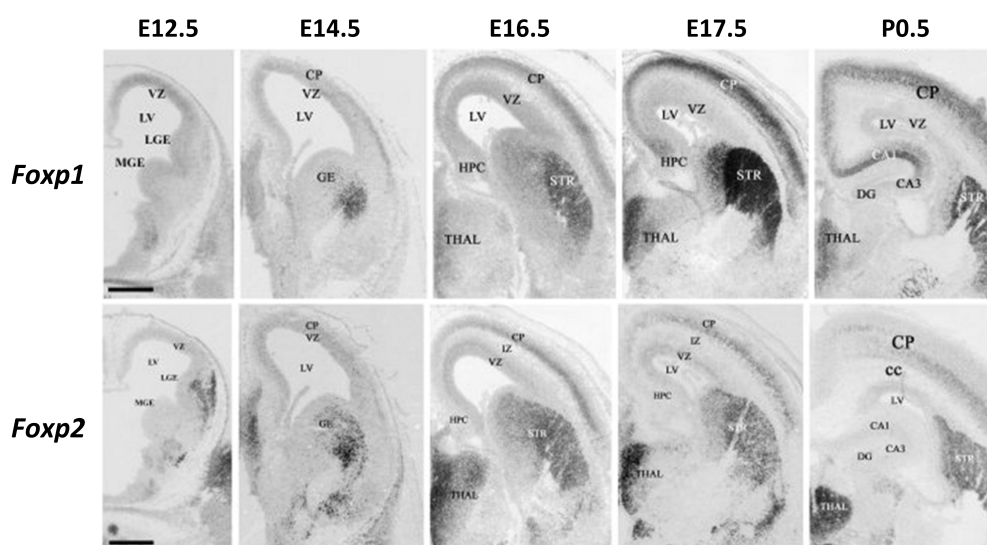


Abbildung 1.3: Expression von *Foxp1* und *Foxp2* während der murinen Gehirnentwicklung. ISH zeigen die Expression von *Foxp1* und *Foxp2* an den Entwicklungstagen E12.5, E14.5, E16.5, E17.5 und P0.5 (Geburt). CC: Corpus callosum; CP: Corticale Platte; DG: Dentaler Gyrus; GE: ganglionäre Eminenz; HPC: Hippocampus; IZ: Intermediäre Zone; LGE: Laterale ganglionäre Eminenz; LV: Lateraler Ventrikel; MGE: Mediale ganglionäre Eminenz; THAL: Thalamus; STR: Striatum; VZ: ventrikuläre Zone. Maßstabsbalken entsprechen 500 μm . Modifiziert nach Ferland *et al.* (2003).

Foxp1 und *Foxp2* im Striatum und Thalamus lässt vermuten, dass beide Transkriptionsfaktoren in diesen Regionen Heterodimere bilden können und somit zusammen Zielgene regulieren (Wang *et al.*, 2003). Wie bereits erwähnt, führen Mutationen im *FOXP2*-Gen zu Sprachentwicklungsstörungen. Erste Anzeichen, dass auch *FOXP1* in die Sprachentwicklung involviert ist, lieferte eine 785 kb Deletion der chromosomalen Region 3p14.1p13 bei Patienten mit einer verzögerten Sprachentwicklung, Kontrakturen, Hypertonie und Blepharophimose. Bei diesen Patienten sind neben dem *FOXP1*-Gen noch drei weitere Gene deletiert (*EIF4E3*, *PROK2*, *GPR27*) (Pariani *et al.*, 2009). Nur wenige Zeit später wurde eine ca. 1 Mb große Deletion bei einem Patienten mit einer Sprachentwicklungsstörung entdeckt, die zu einer Deletion von ausschließlich *FOXP1* führt. Zusätzlich ist bei diesem Patienten die Grobmotorik beeinträch-

tigt und der Junge leidet unter einer Chiari-Malformation (Typ 1). Zu diesem Zeitpunkt war unklar, in wie weit die Haploinsuffizienz von *FOXP1* die Grobmotorik und die Sprachentwicklung beeinflusst, da diese möglicherweise auch durch die Chiari-Malformation des Patienten hervorgerufen werden könnte (Carr *et al.*, 2010). Durch die Veröffentlichung drei weiterer Patienten mit *de novo FOXP1*-Mutationen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Beeinträchtigung der Grobmotorik und die verzögerte Sprachentwicklung auf die Haploinsuffizienz von *FOXP1* zurückzuführen ist. Bei allen drei Patienten war der Beginn der Sprachentwicklung stark verzögert. Erst im Alter von 3,5 Jahren haben die Patienten einzelne Wörter gesprochen. Zwischen dem 5. und 7. Lebensjahr war eine Wiedergabe von Wortkombinationen möglich. Der Wortschatz der drei Patienten beschränkt sich auf ca. 100 Wörter. Ähnlich wie bei den Patienten mit *FOXP2*-Mutationen ist die Grammatik und die Artikulierung stark beeinträchtigt. Jedoch wurde bei den drei Patienten keine verbale Entwicklungsdyspraxie diagnostiziert. Durch nonverbale Intelligenztests konnte festgestellt werden, dass die Patienten mittelschwer geistig behindert sind. Diese geistige Beeinträchtigung konnte bei Patienten mit *FOXP2*-Mutationen nicht festgestellt werden (Horn *et al.*, 2010). Aber nicht nur Deletionen, auch Punktmutationen im *FOXP1*-Gen verursachen einen vergleichbaren Phänotyp (Hamdan *et al.*, 2010; O'Roak *et al.*, 2011). In der Studie von Hamdan *et al.* wird von einer *de novo* „nonsense“-Mutation (R525X) in der Forkhead-Domäne berichtet. Die Patientin leidet wie die Patienten aus der Horn *et al.* Studie unter einer Beeinträchtigung der Grobmotorik und einer Sprachentwicklungsstörung und geistiger Behinderung (leicht bis mittelschwer). Außerdem wurde eine Autismus-Spektrum-Störung diagnostiziert (Hamdan *et al.*, 2010). Dies ist kein Einzelfall, denn bei drei weiteren Patienten konnte ein autistisches Verhalten festgestellt werden (Hamdan *et al.*, 2010; O'Roak *et al.*, 2011; Palumbo *et al.*, 2013).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Vergleich zu Patienten mit *FOXP2*-Mutationen Patienten mit *FOXP1*-Mutationen einen umfassenderen kognitiven Phänotyp haben. Gemeinsam haben jedoch beide Gene, dass ein Defekt zu Sprachentwicklungsstörungen führt. Mutationen im *FOXP2*-Gen führen zur verbalen Entwicklungsdyspraxie, ohne Beeinträchtigung anderer kognitiven Fähigkeiten. Hingegen wirken sich Mutationen im *FOXP1*-Gen globaler auf die Gehirnentwicklung aus. Alle Patienten leiden unter einer beeinträchtigten Grobmotorik und Sprachentwicklungsstörungen. Durchgeführte nonverbale Intelligenztest zeigen eine leichte bis mittelschwere geistige Behinderung und in einigen Fällen führt die Haploinsuffizienz von *FOXP1* zu Autismus. Die Patienten mit Mutationen im *FOXP1*-Gen zeigen somit eindeutig, dass *FOXP1* eine bedeutende Rolle während der Gehirnentwicklung spielt (Bacon und Rappold, 2012).

1.3 Geistige Behinderung

Geistige Behinderung ist eine Form kognitiver Beeinträchtigung, welche signifikante Einschränkungen intellektueller Fähigkeiten und adaptiver Verhaltensweisen umfasst. Die kognitiven Beeinträchtigungen der Patienten mit geistiger Behinderung treten vor dem 18. Lebensjahr auf, wirken sich auf die Entwicklung aus und haben lebenslange Konsequenzen (American Psychiatric Association und American Psychiatric Association, 2000). Die Schwere der geistigen Behinderung wird über die Ermittlung des Intelligenzquotienten (IQ) bestimmt. Basierend auf dem IQ klassifiziert man üblicherweise vier Kategorien. Liegt der IQ zwischen 50 und 69, spricht man von einer leichten Form. Patienten mit einem IQ zwischen 35 und 49 haben eine mittelschwere Form der geistigen Behinderung. Eine schwere Form wird hingegen diagnostiziert, wenn der IQ zwischen 20 und 34 liegt. Bei einem IQ kleiner als 20 liegt eine tiefgreifende geistige Behinderung vor. In der westlichen Welt leiden 1,5 bis 2 % der Bevölkerung unter einer leichten bis mittelschweren geistigen Behinderung. Die Prävalenz für die schwere bis tiefgreifende Form liegt zwischen 0,3 und 0,5 % (Leonard und Wen, 2002) (Abb. 1.4).

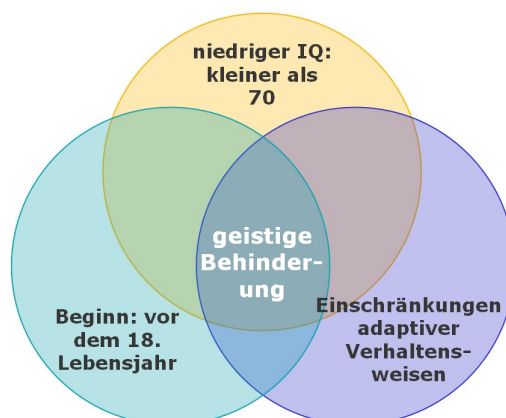


Abbildung 1.4: Merkmale einer geistigen Behinderung.

Bei Patienten mit einer geistigen Behinderung werden vor dem 18. Lebensjahr ein IQ von kleiner als 70 und Einschränkungen adaptiver Verhaltensweisen festgestellt.

Verursacht wird eine geistige Behinderung durch Umwelt-Einflüsse und genetische Faktoren. Häufig auftretende Ursachen sind Frühgeburten, pränatale Infektionen, Chromosomenaberrationen, Gendelationen und Punktmutationen in Genen (Kinsbourne und Graf, 2000). Obwohl nicht-genetische Faktoren zu geistiger Behinderung führen können, sind bei den meisten Patienten mit schweren Formen geistiger Behinderung genetische Veränderungen die Ursache. Es wird geschätzt, dass bei ca. 50 % der Patienten mit geistiger Behinderung eine genetische Ursache zugrunde liegt (McLaren und Bryson, 1987). Durch neue Methoden wie „Comparative genomic hybridization array“ (CGH-Array) und „Next generation sequencing“ wurden im

letzten Jahrzehnt eine Vielzahl von Genen aufgedeckt, die im mutierten Zustand zu geistiger Behinderung führen. Doch trotz dieses Fortschritts sind ca. 60 % der genetischen Ätiologie von geistiger Behinderung unbekannt (Rauch *et al.*, 2006).

Genetische Formen geistiger Behinderung werden in zwei gängige Kategorien unterteilt. Bei den syndromalen Formen tritt die geistige Behinderung immer mit anderen Krankheiten auf. Bei nicht-syndromalen Formen hingegen ist die kognitive Beeinträchtigung die einzige Manifestation der Krankheit. Das heißt, dass die Patienten keine zusätzlichen klinischen, radiologischen oder metabolischen Merkmale aufweisen. Jedoch sind die Grenzen zwischen einer syndromalen- und nicht-syndromalen Form nicht immer eindeutig. In einigen Fällen kann die Zuordnung nicht klar getroffen werden, da zusätzliche Auffälligkeiten nicht spezifisch genug sind, um diese einer anderen Krankheit zuzuordnen (Frints *et al.*, 2002).

1.4 Autismusspektrumstörung

Autismusspektrumstörung ist charakterisiert durch Sprachstörungen, Störungen im sozialen Umgang und der Kommunikation mit Mitmenschen, sowie durch stereotype Verhaltensweisen und eingeschränkten Interessen (American Psychiatric Association und American Psychiatric Association, 2000). Diese ätiologisch und klinisch heterogene Krankheit bricht vor dem 3. Lebensjahr aus und bleibt meist lebenslang bestehen. Zu Beginn des 20. Jahrhundert wurden autistische Verhaltensweisen von Kaner, Asperger und Heller als Syndrome beschrieben (Kaner, 1943; Asperger, 1944; Heller, 1908). Autismusspektrumstörungen umfassen eine breite Spanne autistischer Verhaltensweisen. Diese reicht vom Rett-Syndrom, Asperger-Syndrom, Heller-Syndrom (Childhood disintegration disorder) bis zum idiopathischen und atypischen Autismus (Pervasive developmental disorder not otherwise specified) (American Psychiatric Association und American Psychiatric Association, 2000).

Von Autismusspektrumstörung sind alle ethnischen und sozioökonomischen Gruppen betroffen. Weltweit leiden ca. 0,6 % aller Kinder an dieser Krankheit, wobei Jungen vier Mal so häufig erkranken wie Mädchen (Lintas und Persico, 2009; Baron-Cohen *et al.*, 2005; Elsabbagh *et al.*, 2012). Beim Asperger-Syndrom ist das Jungen-zu-Mädchen-Verhältnis mit 11:1 sogar noch drastischer (Gillberg *et al.*, 2006). Eine Hauptursache für Autismusspektrumstörungen sind genetische Faktoren. Zu dieser Kenntnis führten zahlreiche Zwillings- und Familien-Studien, bei denen eine hohe Erblichkeit beobachtet wurde (Bailey *et al.*, 1995; Ritvo *et al.*, 1985; Risch, 1990). Diese Studien zeigten, dass das Wiederholungsrisiko in Familien mit einem Kind mit Autismusspektrumstörungen bei einem Geschwisterkind ca. 15-20-fach höher ist, als in der durchschnittlichen Bevölkerung. Die Vererbung von Autismusspektrumstörungen stimmt nicht mit den mendelschen Regeln überein, sondern entsteht durch das Zusammenwirken verschiedener Loci im Genom und Umweltfaktoren (Risch *et al.*, 1999). Obwohl für

immer mehr Gene und chromosomale Regionen ein Zusammenhang zu Autismusspektrumstörungen gezeigt werden kann, sind viele genetischen Faktoren bis heute noch nicht erforscht. Durch die derzeit mehr als 100 bekannten Kandidatengene konnten in Neuronen verschiedene Signalwege identifiziert werden. Interessanterweise betreffen eine Vielzahl der Kandidatengene Signalwege in glutamatergen Synapsen (Peça und Feng, 2012). Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz der heterogenen genetischen Ursachen von Autismusspektrumstörungen, in den Neuronen überlappende biologische Prozesse gestört werden. Dies bietet somit einen Ansatzpunkt für mögliche Therapien.

1.5 Genetische Ursachen von Sprachstörungen

Sprache entsteht durch die Interaktion verschiedener Genprodukte im Gehirn. Diese koordinierten Abläufe führen zum Verstehen und zum Benutzen von Wörtern und somit zur Kommunikation mit anderen Menschen (Simms, 2007). Sprachentwicklungsstörungen umfassen Schwierigkeiten bei der Aufnahme und Wiedergabe von Phrasen und Sätzen, sowie der Wortartikulation und der Wortverständlichkeit. Die Ätiologien dieser Störungen variieren und können durch verschiedene Faktoren beeinträchtigt werden. In den letzten Jahrzehnten haben Wissenschaftler genetische Risikofaktoren identifiziert, welchen eine Rolle in der Ätiologie von Sprachstörungen zuzuschreiben ist. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass Sprachentwicklungsstörungen vererbt werden und es häufig zu familiären Aggregationen kommt (Barry *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2007; Conti-Ramsden *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2007). Unterteilt werden Sprachentwicklungsstörungen in vier Kategorien: Stottern, verbale Entwicklungsdyspraxie (engl.: developmental verbal dyspraxia: DVD), spezifische Sprachentwicklungsstörung (engl.: specific language impairments: SLI) und Legasthenie. Eine häufige Form von Sprachstörung ist das Stottern. Hierbei wird durch unkontrollierbare Wiederholungen oder Verlängerungen von Wörtern oder Silben sowie durch Sprachpausen der Sprachfluss unterbrochen. Typischerweise beginnt das Stottern zwischen dem zweiten und vierten Lebensjahr und tritt bei ungefähr 5 % der Bevölkerung auf. Bei 75-80 % der Betroffenen legt sich das Stottern nach einigen Jahren (Bloodstein, 2008). Über genetische Risikofaktoren ist bisher nicht viel bekannt. Es wurden jedoch bei mehreren nicht verwandten Patienten Mutationen in den Genen *GNPTAB* (*N-Acetylglucosamin-1-Phosphat Transferase, Gamma Untereinheit*) und *NAGPA* (*N-Acetylglucosamin-1-Phosphodiester Alpha-N-Acetylglucosaminidase*) identifiziert (Kang *et al.*, 2010). Daher sind diese beiden Gene zwei vielversprechende Kandidatengene. Das erste Gen, für welches gezeigt werden konnte, dass es für die Sprachentwicklung essentiell ist, ist *FOXP2*. Individuen mit heterozygoten Mutationen im *FOXP2*-Gen haben Schwierigkeiten bei der Artikulation von Sätzen (Hurst *et al.*, 1990). Diese Sprachstörung wird als verbale Entwicklungsdyspraxie bezeichnet und ist charakterisiert durch Schwierigkei-

ten bei der Kontrolle der orofazialen Muskeln, welche zu einer defizitären Aussprache führen. Spezifische Sprachentwicklungsstörungen (engl.: specific language impairments: SLI) umfassen einen verzögerten oder abweichenden Erwerb der Sprache, bei dem die Aussprache und Aufnahme von Sprache gestört sind (Tomblin *et al.*, 1997). Genetische Faktoren spielen bei dieser Sprachstörung eine entscheidende Rolle. In Studien wurden Mutationen in dem Zielgen *CNTNAP2* (*Contactin-associated protein-like 2*) von *FOXP2* mit spezifische Sprachentwicklungsstörungen assoziiert (Vernes *et al.*, 2008). Genetische Studien zu Legasthenie schlugen *ROBO1* (*Roundabout homolog 1*), *DCDC2* (*Doublecortin domain-containing protein 2*) und *KIAA0319* als potentielle Kandidatengene vor (Hannula-Jouppi *et al.*, 2005; Harold *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2005). Legasthenie ist eine Sprachstörung, bei der die betroffenen Kinder trotz normaler Bildung und Intelligenz Schwierigkeiten beim Lesen und der Rechtschreibung haben. Es wird vermutet, dass Defizite der Sprachverarbeitung, wie die Wahrnehmung von Sprachgeräuschen, Hauptursache dieser Krankheit sind (Fisher und DeFries, 2002; Morris *et al.*, 1998; Snowling, 2001). Da Legasthenie jedoch häufig durch Aufmerksamkeitsdefizit und Hyperaktivitätsstörungen sowie spezifische Sprachentwicklungsstörungen begleitet wird, ist eine klare Definition oft schwierig (Willcutt *et al.*, 2005; Bishop und Snowling, 2004).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Während der Gehirnentwicklung des Menschen spielt der Transkriptionsfaktor FOXP1 eine wichtige Rolle. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine Haploinsuffizienz von *FOXP1* die Sprachentwicklung, die Intelligenz und die Grobmotorik beeinträchtigt wird. Zudem kann ein heterozygoter Verlust des *FOXP1*-Gens zu Autismus-Spektrumstörungen führen (Carr *et al.*, 2010; Horn *et al.*, 2010; Hamdan *et al.*, 2010; O’Roak *et al.*, 2011; Palumbo *et al.*, 2013). Obwohl diese Studien zeigen, dass FOXP1 in die Ätiologie verschiedener kognitiver Krankheiten involviert ist, ist die Rolle von FOXP1 während der Gehirnentwicklung immer noch unklar.

Um ein besseres Verständnis über die Rolle von FOXP1 im Gehirn zu erhalten, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, Zielgene von *Foxp1* zu identifizieren und zu charakterisieren. Für diese Studien wurden verschiedene embryonale Entwicklungsstadien der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie verwendet, bei der die Expression von *Foxp1* durch Verpaarung mit der *Nestin-Cre*-Mauslinie Gehirnspezifisch ausgeschaltet wurde. Des Weiteren wurden Wildtyp Mausgehirne und humane und murine Neuroblastoma-Zelllinien verwendet.

2

Material

2.1 Puffer, Medien und Lösungen

2.1.1 Selbst hergestellte Puffer, Medien und Lösungen

Allgemein

10x PBS, pH 7,4

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄

ad 1 l ddH₂O

1x TBS-T

1x PBS + 0,1% Tween 20

10x-Genotypisierungs Puffer

750 mM Tris-HCl, pH 9,0

200 mM (NH₄)₂SO₄

0,1 % Tween 20

*Gelelektrophoretische DNA-Auftrennung***6x OrangeG Proben-Puffer**

10 mM Tris-HCl, pH 7,6

0,15 % Orange G (Fluka)

0,03 % Xylen Cyanol FF

60 % Glycerin

60 mM EDTA

10x TAE

40 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA

*Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen***LB-Agar (1,5 %)**

LB-Medium (1 l)

15 g Bacto-Agar (BD)

LB-Medium

10 g Trypton (BD)

5 g Hefeextrakt (BD)

10 g NaCl

ad 1 l ddH₂O

SOC-Medium

0,5 g NaCl

0,186 g KCl

0,952 g MgCl₂

3,603 g Glukose

20 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefe Extrakt

ad 1 l ddH₂O

Ampicillin (Roth)

50 mg/ml in Ethanol lösen und sterilfiltrieren (Endkonzentration: 50 µg/ml)

IPTG/X-Gal-Platten

800 µl IPTG (100 mM)
2 ml X-Gal (20 mg/ml)
1 ml Ampicillin (50 mg/ml)
ad 1 l LB-Agar (1,5 %)

*ChIP Experimente***Modifizierter RIPA Puffer**

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
1 % NP-40
0,25 % Na-Deoxycholate
1 mM EDTA

Zell-Lysis Puffer

5 mM PIPES, pH 8,0
85 mM KCl
0,5 % NP40

Zellkern-Lysis Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,5
10 mM EDTA
1% SDS
Frisch hinzugeben: Protease Inhibitor Cocktail (1 µl/1ml) (Serva)

TE Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA

Elutionspuffer

10 mM Tris, pH 7,5
1 mM EDTA
1 % SDS

*RNA in situ Hybridisierung***20x SSC**

3 M NaCl

0,3 M Sodium Citrate

ad 1 l ddH₂O**1M (10x) Triethanolamine, pH 8,0**

66,5 ml Triethanolamine

20 ml HCl

413,5 ml ddH₂O**50x Denhardts Lösung**

2 % BSA (ICN 810661)

2 % Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)

2 % Ficoll 400

Hybridisierungspuffer

50 % Formamide

5x SSC

0,3 mg/ml Yeast tRNA

0,1 mg/ml Heparin

1x Denhardts Lösung

0,1 % Tween 20

5 mM EDTA in ddH₂Oad 50 ml ddH₂O**Kammerpuffer**

50 % Formamid

5 x SSC in ddH₂O**alkalischer Phosphatase-Puffer**

100 mM Tris-HCl, pH 9,5

50 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0,1 % TWEEN 20

ad 16 ml ddH₂O

Immunfluoreszenz-Färbungen

Block-Lösung

- 10 % Ziegen Serum
- 0,1 % Tween 20
- in PBS ansetzen

2.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose (Life Technologies)
- Opti-MEM Reduced Serum Medium with GlutaMAX (Life Technologies)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Life Technologies)
- Fetal Bovine Serum Gold (PAA)
- PenStrep-Lösung, Penicillin (100 U/ml)/ Streptomycin (100 µg/ml) (Life Technologies)
- L-Glutamine, 100x (Life Technologies)
- MEM-NEAA, 100x (Life Technologies)
- PBS, pH 7,2 (Life Technologies)
- Trypsin-EDTA, 0,05 % (Life Technologies)

2.2 Reagenzien und Kits

Kits zur DNA-Isolierung und Aufreinigung

- illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)
- MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen)
- MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)
- MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)
- PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Life Technologies)

Kits und Enzyme für PCRs

- Taq DNA Polymerase mit ThermoPol Puffer, für Standard PCRs, Colony PCRs und Genotypisierungs-PCRs (New England Biolabs)
- Phusion Hot Start II DNA Polymerase, für Klonierungen (Thermo Scientific (F-549L))
- Fidelity Taq DNA Polymerase, für Klonierungen und semiquantitative PCRs (USB)
- SensiFAST SYBR No-ROX Mix, für qPCRs (Bioline)

Kits und Enzyme zur Klonierung von DNA-Fragmenten

- pSTBlue-1 AccepTor Vector Kit (Novagen/Merck)
- Restriktionsenzyme und Puffer (Fermentas)
- T4 DNA-Ligase (Promega)

Kits und Enzyme zur Sequenzierung

- Exonuclease I (Fermentas)
- FastAP Thermosensitive Alkalische Phosphatase (Fermentas)
- TempliPhi-Kits (GE Healthcare)
- DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare)

Reagenz zur RNA-Isolierung und Aufreinigung

- TRIzol Reagent (Life Technologies)

Kit zur cDNA-Synthese

- DIG RNA Labeling Mix (Roche)

Kits zur *in vitro* RNA-Synthese

- DIG RNA Labeling Mix (Roche)
- MEGAscript T7 Kit (Ambion)
- MEGAscript SP6 Kit (Ambion)

Kits und Reagenzien zur Transfektion von eukaryotischen Zellen

- Lipofectamine2000 (Life Technologies)
- Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies)

Kit zur Messung der Luciferase-Aktivität in eukaryotischen Zellen

- Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 2.1: Verwendete PCR-Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
Floxed_for	CTCCTAGTCACCTTCCCCAGTGC	Genotypisierung
Floxed_rev	GAACACTGTCGAATGACCCTGC	
NesCre_for	AGTGCTGACTCTCCTCGGCTT	
NesCre_rev	CCAGACCTGTTCCACCTCTG	
pGL_RVprimer3_for	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	pGL3 basic Vektorprimer
pSTBlue-1_RVer_for	ATGACCATGATTACGCCAAGC	pST Blue-1 Vektorprimer
pSTBlue-1_UVer_rev	GTTTTCCAGTCACGACGTTG	
Foxp1(m)_ISH_for	ATCCAGAACGGGTCCAGCGGTG	Klonierung in pST Blue-1
Foxp1(m)_ISH_rev	AGGCTGCCCGGCTGAATTGTT	
Pcdh17(m)_ISH_for	GCGCACTTGGAGAGCAACGC	
Pcdh17(m)_ISH_rev	TCACCTCTGACCGGGGCGAG	
Chrna4(m)_XhoI_F_for	ATTACTCGAGGACACTACCAGCCCCTCAAG	Klonierung in pGL3 basic
Chrna4(m)_KpnI_F_rev	ATTAGGTACCGGAAGTCAGGTGAGGAAGGA	
Pcdh17(m)_KpnI_12_for	ATTAGGTACCAATGATGTTTCATTTCATTGATTTT	
Pcdh17(m)_XhoI_12_rev	ATTACTCGAGACCCGGGAAGTTC AATTCAG	
Foxp1(m)_BamHI_for	ATTAGGATCCATGATGCAAGAATCTGGGTCT	Klonierung in pcDNA3
Foxp1(m)_XhoI_rev	AATACTCGAGTCACTCCATGTCCTCATTAC	

Tabelle 2.2: Primer für semiquantitative und quantitative PCRs.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	
qFOXP1(h)_for	GCATACCAACAGCAACGAGA	
qFOXP1(h)_rev	CTTCAGCTTCTCTGGATCG	
qPCDH17(h)_for	CCAGCTTCACCGACAAGGGAC	
qPCDH17(h)_rev	CTGCTGCCTGCTGCCATGTAAT	
qHPRT1(h)_for	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA	
qHPRT1(h)_rev	AAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTGAG	
qSDHA(h)_for	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	
qSDHA(h)_rev	CCACCACTGCATCAAATTCATG	
qFoxp1(m)_for	GCACCAACAGCAACGAGA	quantitativ
qFoxp1(m)_rev	GGTCAAATCTGGACTGTGGTTGGC	
qChrna4(m)_for	GTGAGCCATGGAGATCGGGG	
qChrna4(m)_rev	CGGGTCTCTATGTGGCTGCTA	
qPcdh17(m)_for	CTGCCACACCAGCTTCACCGG	
qPcdh17(m)_rev	TGCTGCCTGCTGCCATGTAA	
qHprt1(m)_for	TCCTCTCAGACCGCTTTT	
qHprt1(m)_rev	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	
qSdha(m)_for	CATGCCAGGAAGATTACAAA	
qSdha(m)_rev	GTTCCCAAACGGCTTCT	
FOXP1(h)_for	TACTAGAGTGCGGCGGTCTT	
FOXP1(h)_rev	GCATTTGCTGGGAGTGATA	
CHRNA(h)_for	GCCGGACATCGTCTCTAC	
CHRNA(h)_rev	GGTAGATCTCGGCACAGCAC	
ARF1(h)_for	GCCAGTGCCTTCCACCTGTC	
ARF1(h)_rev	GCCTCGTTCACAGCTCTCTG	
Chrna4(m)_promoterF_for	GACACTACCAGCCCCTCAAG	semiquantitativ
Chrna4(m)_promoterF_rev	GGAAGTCAGGTGAGGAAGGA	
Pcdh17(m)_promoter12_for	AATGATGTTTCATTTATTGATTTT	
Pcdh17(m)_promoter12_rev	ACCCGGGAAGTTCAATTCAG	
Kontrollregion(m)_for	TTGAGCCAAACTGGGAGACT	
Kontrollregion(m)_rev	TCATCCTTGCTTGGTCCTTT	

Tabelle 2.3: siRNAs (Stealth Select RNAi siRNAs; Life Technologies).

siRNA Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Oligo ID
siRNA#1	UCUACUUCAUCCACUGUCCat	#s99211
siRNA#2	UUUCGUUUAGUGUUAGCUGct	#s99212
siRNA#3	UGGAGUAUGAGGUAAGCUctg	#s99213
Kontroll-siRNA		#ASO0JDS2

2.4 Vektoren

Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
pcDNA3	Life Technologies	Expression
pGL3 basic	Promega	Luciferase-Assay
pRL-TK	Promega	Luciferase-Assay
pSTBlue-1	Novagen	<i>in vitro</i> Transkription

2.5 Antikörper

Tabelle 2.5: Primärantikörper.

Antikörper	Spezifität	Tier	Hersteller	Katalognummer
Anti-Chrna4	Mensch, Maus, Ratte, Rind, Huhn	Kaninchen	Aviva System Biology	AVARP13015_P050
Anti-Digoxigenin-AP	Schaf	Digoxigenin	Roche	11 093 274 910
Anti-Foxp1	Mensch, Maus, Ratte	Kaninchen	Abcam	ab16645
Anti-Foxp1 (JC12)	Mensch, Maus	Maus	Abcam	ab32010
Anti-RNA Polymerase II, CTD (8WG16)	Mensch, Maus, Hefe	Maus	Millipore	05-952
IgG	Mensch	unspezifisch	Sigma	I2511

Tabelle 2.6: Sekundärantikörper.

Antikörper	Tier	Konjugat	Hersteller	Katalognummer
Anti-Maus IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 488	Life Technologies	A11029
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 568	Life Technologies	A11036

2.6 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* NovaBlue (Novagen)
- *Escherichia coli* MAX Efficiency DH5 α -T1 (Life Technologies)

2.7 Datenbanken, Internetressourcen und Software

- Allen brain atlas (<http://www.brain-map.org/>)
- ECR-Browser (<http://ecrbrowser.dcode.org/>)
- Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>)
- GelQuant.NET, Version 1.8.2 (BiochemLabSolutions.com)
- Gene Ontology-Datenbank (<http://www.geneontology.org/>)
- Geneious Basic, Version 4.8.3 (Biomatters)
- UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>)
- GraphPad Prism 5, Version 5 (GraphPad Software)
- ImageJ, Version 1.42g (National Institute of Health, USA)
- KEGG-Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/>)
- MikroWin 2000, Version 4 (Mikrotek)
- National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)
- NIS-Elements Software, Version 4 (Nikon)
- NIS-Elements Viewer, Version 3.2 (Nikon)
- Primer3 - Primerdesign (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)

3

Methoden

3.1 DNA-basierte Methoden

3.1.1 Plasmidextraktion aus Bakterien

Plasmid-tragende Bakterien wurde in 150 ml (Midiprep) oder 5 ml (Miniprep) LB-Medium angeimpft und 12 – 16 Stunden (h) bei 37 °C (200 rpm) inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA wurde mit Kits (Kapitel 2.2) über Säulen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mittels photometrischer Messungen (Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer; Thermo Scientific) bestimmt.

3.1.2 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden für analytische Zwecke durch Elektrophorese in horizontalen Agarose-Gelen der Größe nach aufgetrennt. Die DNA wandert hierbei auf Grund ihrer negativen Nettoladung zur Anode. Kleine Fragmente können sich im Gel schneller bewegen als große, hierdurch wird eine Auftrennung nach der Größe erreicht. Die Agarosekonzentration variierte zwischen 1 – 2 % (w/v). Agarose wurde in 1x TAE gelöst und aufgeköcht. Nach der Abkühlung auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid (1 µg/ml Endkonzentration) hinzugegeben und das Gel gegossen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die DNA-Proben mit 1/6 Volumen OrangeG-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Elektrophorese-puffer bei Spannungen zwischen 60 und 140 V durchgeführt. Durch die Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid in die DNA-Fragmente konnte die Auftrennung dieser anschließend unter einem UV-Transilluminator (Quantum-ST4; PEQLAB) kontrolliert und dokumentiert werden.

3.1.3 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Sequenzen spezifischer Länge und Sequenz *in vitro*. Das Prinzip der DNA-Amplifikation besteht hierbei aus 3 Schritten:

1. Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 94 °C.
2. Anlagern (Annealing) von zwei Oligonukleotidprimern an die Einzelstrang-DNA (Template) bei der spezifischen Anlagerungstemperatur T_A der Primer.
3. Die Elongation der Primer erfolgt in 5' → 3'-Richtung durch eine hitzestabile Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*). Das Anhängen neuer dNTPs an das freie 3'-OH-Ende führt zur Synthese von komplementären DNA-Strängen. Die durchschnittliche Syntheseleistung der Taq-DNA-Polymerase beträgt dabei 1 kb/min.

Diese drei Schritte bilden einen PCR-Zyklus. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die DNA-Menge der zu amplifizierenden Sequenz, wodurch diese exponentiell mit der Zahl der Zyklen ansteigt. Zur Amplifizierung von DNA für verschiedene Zwecke wie z.B. für Genotypisierung, Klonierung oder Kolonie-PCRs wurden „eppgradient Mastercycler“ (Eppendorf) verwendet.

Allgemeine Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

10 x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (25 nM)	0,3 µl
Primer for (10 µM)	0,5 µl
Primer rev (10 µM)	0,5 µl
Template (1-100 ng DNA)	1 µl
Polymerase	0,2 µl
ddH ₂ O	20 µl
Σ	25 µl

Zu jeder PCR wurde eine Negativkontrolle (Ansatz mit 1 µl ddH₂O, statt 1 µl Template-DNA) angesetzt.

Alle PCR- Standardprogramme leiteten sich von folgendem Schema ab:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Primeranlagerung	T _A	30 sec	25-40 Zyklen
Elongation	72 °C	1min/kb	
Abschließende Elongation	72 °C	5 min	
Abkühlen	4 °C	∞	

Die Dauer der Elongation richtete sich je nach der Größe der zu amplifizierenden Sequenz. Standardmäßig wurden die Primer für die PCR so gestaltet, dass eine Annealing-Temperatur (T_A) von 60 °C angewendet werden konnte.

Alle PCRs wurden in 0,2 ml PCR-Gefäßen (Biozym) angesetzt.

3.1.4 Sequenzierung: Mega BACE

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen basieren auf dem Prinzip der Kettenabbruch-Reaktion durch Didesoxynukleotid-Zugabe nach Sanger.

Didesoxynukleotide besitzen keine 3'-Hydroxylgruppe. Daher führt der Einbau eines Didesoxynukleotids zum Abbruch der Synthese des DNA-Stranges. Bei der Sequenzierungs-PCR, dem sogenannten Cycle Sequencing, werden neben Desoxynukleotiden geringe Mengen von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden eingesetzt. Die Abbruchreaktionen führen zu einem heterogenen PCR-Produkt, in dem DNA-Fragmente verschiedenster Größe vorliegen, die jeweils durch das zuletzt eingebaute Didesoxynukleotid fluoreszenzmarkiert sind.

In automatischen Sequenziergeräten werden die Fragmente über ein Gel ihrer Größe nach aufgetrennt und der jeweilige Farbstoff, der eine der vier Basen der DNA anzeigt, mittels Laser detektiert. Aus den so ermittelten Daten lässt sich auf die Basensequenz des untersuchten DNA-Stückes schließen.

Experimentelle Durchführung:

Die zu sequenzierende Sequenz wurde in einer PCR mit der Taq-DNA-Polymerase amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels Exonuklease I (ExoI) und Thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAP) aufgereinigt. Während Exonuklease I den Abbau von Nukleotiden einzelsträngiger DNA (von 3' nach 5') katalysiert, entfernt die Phosphatase die 5'-Phosphatreste der DNA-Moleküle.

PCR-Produkt	2,5 μ l
FastAP (1 U/ μ l)	0,5 μ l
ExoI (20 U/ μ l)	0,25 μ l
ddH ₂ O	0,75 μ l
Σ	4 μ l

Die Enzyme wurden bei 37 °C für 15 min aktiviert und anschließend bei 85 °C für 15 min inaktiviert.

Sequenzier-PCR:

PCR-Produkt	2 μ l
Primer (5 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Premix	1 μ l
ddH ₂ O	1,5 μ l
Σ	5 μ l

Sequenzier-PCR-Programm:

Denaturierung	94 °C	20 sec	
Primeranlagerung	60 °C	60 sec	25 Zyklen
Abkühlen	4 °C	∞	

Nach Beendigung der Sequenzierreaktion wurden je 15 μ l ddH₂O zu den Proben hinzu gegeben. Das Endvolumen der Sequenzierreaktion betrug somit 20 μ l. Die Aufreinigung der Sequenzierreaktion geschah mit Hilfe von Sephadex-G50 in Millipore Multiscreen-HV-Platten. Dabei werden nicht eingebaute Didesoxynukleotide, überschüssige Primer und Polymerase von den eigentlichen Sequenzierprodukten entfernt. Hierfür wurde eine 96-Loch-Multiscreen-HV-Platte mit Sephadex-G50-Pulver befüllt. In jedes Loch wurden 300 μ l ddH₂O zugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit bei 910 x g für 5 min abzentrifugiert. Die dabei austretende Flüssigkeit wurde von einer herkömmlichen 96-Loch-Platte aufgefangen. Erneut wurde 150 μ l ddH₂O pro Loch zugegeben. Die Flüssigkeit wurde bei 910 x g für 5 min abzentrifugiert. Hiernach wurde die vorbehandelte MultiScreen-Platte mit der Sequenzierreaktion beladen und bei 910 x g für 5 min zentrifugiert. Das entstehende Eluat (=aufgereinigte Sequenzierreaktion) wurde in einer frischen 96-Loch-Platte aufgefangen. Die technische Bedienung des MegaBACE100-Sequenziergerätes erfolgte nach den Herstellerangaben.

Die Sequenzierungen wurden standardmäßig unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Injektion der Proben: 3,5 kV für 30 sec
- Lauf: 9 kV für 150 min, Temperatur 44 °C
- Puffer: 1x LPA-Puffer

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Geneious Basic Software ausgewertet.

3.1.5 Klonierung

Restriktionsverdau

Die erforderliche Menge Plasmid-DNA bzw. die Gesamtmenge einer PCR-Amplifikation wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer unter Zusatz der entsprechenden FastDigest-Restriktionsenzyme (Fermentas) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen).

Ligation von DNA-Fragmenten

Zur gerichteten Klonierung von Plasmid- und Expressionskonstrukten wurden die mit Restriktionsenzymen behandelten Vektoren und PCR-Produkte oder DNA-Fragmente (Insert-DNA) unter Verwendung der T4 DNA-Ligase (Promega) miteinander ligiert. Die Vektor-DNA wurde mit dreifach molarem Überschuss an Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl 3 h bei RT inkubiert.

Ligationsansatz:

Linearisierter Vektor	100 ng
Insert-DNA	3-fache molare Menge
10 x T4 DNA-Ligase Puffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Transformation von Bakterienzellen durch Hitzeschock

Zur Transformation von DNA in Bakterien ist es notwendig, die Zellwand und die Cytoplasmamembran vorab zu permeabilisieren. Hierfür wurden chemisch kompetente Bakterien

verwendet, in welche die gewünschte Plasmid-DNA mittels Hitzeschock wie folgt eingeschleust wurde:

- Chemisch kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut.
- 2 μ l Ligationsprodukt wurden hinzugegeben und auf Eis für 30 min inkubiert.
- Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec und es folgte eine Inkubation für weitere 2 Minuten auf Eis.
- 250 μ l SOC-Medium wurden hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C im Schüttelheizblock inkubiert.
- 50-150 μ l des Ansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin und bei gewünschter Blau-Weiß-Selektion mit IPTG und X-Gal ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde der Erfolg der Ligation und Transformation mittels Kolonie-PCR überprüft, bei der Bakterienklone als Template verwendet wurden.

Herstellung von Bakterien-Glycerinstocks

Bakterienzellen können in Glycerin bei -80 °C gelagert werden. Hierfür werden 700 μ l einer frischen Bakterien-Übernachtskultur mit 300 μ l sterilem Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2 RNA-basierte Methoden

3.2.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen oder embryonalen Geweben wurde mit TRIzol (Life Technologies) isoliert. Alle RNAs wurden DNaseI verdaut (Ambion) und anschließend spektrometrisch mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) auf Reinheit und Konzentration überprüft.

3.2.2 cDNA-Synthese

Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde mit dem GoScript Reverse Transcription System (Promega) durchgeführt. Als Primer wurden hierbei Random Hexamere und Oligo(dT)₁₅ verwendet, die an die gesamte zelluläre RNA binden. Somit kann die gesamte zelluläre RNA

durch die reversen Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA- Polymerase) in cDNA umgeschrieben werden.

Experimentelle Durchführung:

RNA (1 µg/Reaktion)	x µl
Primer (Oligo(dT)15) [500 µg/ml]	0,5 µl
Random Primer [500 µg/ml]	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 5 µl

Inkubation:

70 °C	5 min
Eis	5 min

GoScript 5X Reaction Buffer	4,0 µl
MgCl ₂ (2 mM)	1,2 µl
dNTP Mix	1,0 µl
RNasin Ribonuclease Inhibitor [40 U/µl]	0,5 µl
GoScript Reverse Transcriptase	1,0 µl
ddH ₂ O	ad 15 µl

Inkubation:

25 °C	5 min
42 °C	1 h
70 °C	15 min

3.2.3 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Die quantitative Expressionsanalyse beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die Quantifizierung der neu synthetisierten doppelsträngigen Nukleinsäure-Moleküle erfolgt durch Fluoreszenzfarbstoffe (z.B.: SYBR Green), die in die DNA eingelagert werden. Die Fluoreszenz nimmt dabei im Laufe der PCR proportional zur Menge an vorliegendem PCR-Produkt zu. In der so genannten quantitativen-Real-Time-PCR wird der Verlauf der Amplifikation in Echtzeit detektiert und gleichzeitig vom Gerät aufgezeichnet. Die Software erstellt dabei eine Grafik, in der der jeweilige PCR-Zyklus (x-Achse) gegen die ermittelte Fluoreszenz (y-Achse) aufgetragen wird. Bei einem korrekten Verlauf entsteht dabei für jedes gemessene Transkript eine sigmoide Kurve.

Experimentelle Durchführung:

Zur quantitativen Bestimmung der Menge eines Transkriptes in cDNA-Proben wurden qPCRs durchgeführt, bei denen der Real-Time Thermocycler qTOWER (Analytik Jena) in Echtzeit die DNA-Amplifikation detektiert. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die relativen Expressionswerte verschiedener Transkripte wurden entsprechend der delta-delta-Ct-Methode durch Normalisierung auf mehrere „Housekeeping-Gene“ (*Sdha*, *Hprt1*) ermittelt. Alle eingesetzten Primerpaare wurden vor Verwendung getestet und auf ihre Eignung für qPCR geprüft.

Reaktionsansatz:

2 x SensiFAST SYBR No-ROX Mix	5 µl
Primermix for/rev (je 10 µM)	0,2 µl
cDNA	1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	
Elongation	60 °C	1 min	40 Zyklen
Schmelzkurve	60-95 °C	6 sec ΔT 1 °C	

3.2.4 RNA *in situ* Hybridisierung (ISH)

Die Methode der RNA *in situ* Hybridisierung (ISH) ermöglicht den Nachweis von endogener RNA in Geweben. Das Prinzip beruht auf der Hybridisierung von einzelsträngiger, markierter (Digoxigenin) antisense-RNA-Sonden mit komplementärer endogener RNA. Durch die Bindung eines Digoxigenin-spezifischen Antikörpers (Anti-Digoxigenin-AP), welcher mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist, wird nach Zugabe des entsprechenden Substrates (NBT-BCIP) eine farbliche Präzipitation (blau) detektiert. Somit kann die Expression spezifisch nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür Gefrierschnitte muriner Gehirne (E13-E16) verwendet.

Experimentelle Durchführung:

- Gefrierschnitte wurden für 10 min getrocknet
- 20 min in 4 % DEPC-PBS fixiert
- 2x 5 min in DEPC-PBS gewaschen
- Proteinase K-Behandlung: 10 µg/ml Proteinase K in PBS für 15-45 min

- 1x in DEPC-PBS gewaschen
- 15 min in 4 % DEPC-PBS fixiert
- 1x in DEPC-H₂O gewaschen
- Schnitte wurden für 10 min in 0,1M RNAse-freiem Triethanolamin-HCl (pH 8,0) + 200 µl Acetanhydrid inkubiert
- 1x in DEPC-PBS gewaschen

Prä-Hybridisierung:

- Zugabe von Hybridisierungs-Puffer
- 3-4 h Inkubation bei 65 °C

Hybridisierung:

- Sonden wurden 1:800 in Hybridisierungs-Puffer verdünnt
- Über Nacht bei 65 °C inkubiert
- In 2x SSC bei 65 °C für 15 min gewaschen
- In 2x SSC bei RT für 15 min gewaschen

RNAase Verdau:

- RNAse A [10 µg/ml] und [1 mU/ml] RNase T1 wurden in 2x SSC verdünnt
- Schnitte wurden bei 37 °C für 45 min inkubiert
- 2x in 2x SSC bei RT für 5 min gewaschen
- 2x in 2x SSC bei 65 °C für 30 min gewaschen
- In 2x SSC bei RT für 2 min gewaschen
- 2x in PBT bei RT für 20 min gewaschen
- 45 min in PBT mit 10 % Pferdeserum geblockt
- Anti-DIG-Antikörper wurde 1:2000 in PBT mit 10 % Pferdeserum verdünnt
- Über Nacht bei 4 °C inkubiert
- 3x mit PBT bei RT für 20 min gewaschen
- 2x in Alkalischen Phosphatase-Puffer für 5 min gewaschen
- NBT/BCIP wurde 1:100 in Alkalischen Phosphatase-Puffer verdünnt
- 8-12h bei RT entwickelt (Farbreaktion), bis die gewünschte Farbintensität erreicht war
- 2x mit PBS bei RT gewaschen
- 2x mit H₂O bei RT gewaschen
- Getrocknete Schnitte wurden mit Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckt und bei RT gelagert

3.2.5 Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip Array Technologie

Zur Identifizierung potentieller Zielgene von *Foxp1* wurde die Expression von Genen in Zellen mit einer normalen *Foxp1* Expression mit Zellen, in denen die *Foxp1* Expression herunterreguliert war, mittels Affymetrix GeneChips verglichen. Dabei wurden zwei Screening-Ansätze durchgeführt.

Im ersten Ansatz wurde die Expression von *FOXP1* in humanen SH-SY5Y Zellen durch *FOXP1*-spezifische siRNAs (#1 und #3) herunterreguliert und mit Zellen verglichen, welche mit Kontroll-siRNAs (scrambled siRNAs) transfiziert waren. Hierbei wurde jeweils RNA von zwei unabhängigen Experimenten gepoolt. Die Genexpression dieser RNAs wurde mittels der Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix) verglichen.

Für einen weiteren Screening-Ansatz wurde RNA aus Vorderhirnen von E16 Embryonen der *Foxp1* Knockout-Mauslinie (*Foxp1*^{-/-}-Mauslinie) verwendet. Die Expression von *Foxp1* beginnt nach 13 Tagen embryonaler Entwicklung (E13). Für die Identifizierung von Genen, die differenziell in Vorderhirnen von Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie exprimiert sind, wurde das Entwicklungsstadium E16 ausgewählt. Zu diesem Zeitpunkt ist *Foxp1* stark im Cortex und Striatum exprimiert. Insgesamt wurde die Genexpression von zwei Würfen (drei Wildtyp (wt) und drei KO Embryonen) auf Mouse Gene 1.1 ST Array (Affymetrix) verglichen.

Die Durchführung der Microarray-Experimente, sowie die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Norbert Gretz vom Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät Mannheim. Für die cDNA und cRNA Synthese wurden das SuperScript Choice System (Life Technologies), das ENZO BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit (EnzoLifeSciences) und CHROMA SPIN-100 columns (Clontech) verwendet. Die cRNA wurde nach einem von Affymetrix definierten Protokoll fragmentiert und auf die Affymetrix GeneChips hybridisiert. Durch die Anwendung von biotinyliertem Anti-Streptavidin-Antikörper und einer anschließenden Inkubation in Streptavidin-Phycoerythrin wurde die Intensität der Signale verstärkt. Für die Erfassung der Signale wurden die Microarrays mit dem Affymetrix Scanner und der Affymetrix Microarray Suite Software eingelesen. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der JMP Genomics 4.0 Software (SAS Institute) und basiert auf der Varianzanalyse (ANOVA).

3.3 Protein-basierte Methoden

3.3.1 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Zur Identifizierung von Bindungsstellen von *Foxp1* im Mausgenom wurden Chromatin-Immunpräzipitationen-Experimente (ChIP-Experimente) durchgeführt. Diese Methode ermöglichte es, die Interaktion von Proteinen mit der DNA *in vivo* zu analysieren. Die Durchführung von

ChIP-Experimenten erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die an die DNA gebundenen Proteine mit dieser durch Formaldehyd vernetzt (Crosslinking). Anschließend wurde das Chromatin mittels Ultraschall zerkleinert (Sonifizierung). Im nächsten Schritt wurde Foxp1 mit einem Foxp1-Antikörper (ab16645, Abcam) immunopräzipitiert (Immunopräzipitation (IP)) (Gabut *et al.*, 2011). Zum Schluss wurden die DNA-Protein-Komplexe getrennt (Reverse Crosslinking) und die DNA aufgereinigt. Als Negativkontrolle wurde humanes IgG (Sigma) verwendet.

Anschließend wurde die aus den ChIP-Experimenten gewonnene DNA in PCRs mit spezifischen Primern (gerichtet gegen die zu untersuchenden Promotorsequenzen) eingesetzt und so Bindungsstellen von Foxp1 analysiert.

Für die ChIP-Experimente wurde Vorderhirn-Gewebe von Wildtyp-Embryonen verwendet. Wie auch bei den Genexpressionsanalysen wurde auf Grund der starken Foxp1-Expression im Cortex und Striatum das Entwicklungsstadium E16 gewählt. Bei dem folgenden Protokoll wurden für jede Immunopräzipitation zwei Vorderhirne des Entwicklungsstadiums E16 verwendet.

Experimentelle Durchführung:

Bindung der Antikörper an Magnetkügelchen

- 100 µl Dynabeads Protein A/G wurden (pro Immunopräzipitation) 2x in 300 µl 2 % BSA/PBS-Lösung gewaschen
- Magnetkügelchen (Protein A/G Mag Beads, Gen Script) wurden 10 min in 500 µl 2 % BSA/PBS-Lösung inkubiert (Drehrad)
- 5 µg Antikörper wurden in 500 µl 2 % BSA/PBS-Lösung gelöst und zu den Magnetkügelchen gegeben
- Anschließend wurde 4 h bei RT inkubiert (Drehrad)

Sezernierung und Dissoziation von E16 Vorderhirnen

- Pro 2 ml Reaktionsgefäß wurden 4 sezernierte Vorderhirne in 0,5 ml PBS mit einem Douncer zerkleinert
- Anschließend wurden die Zellen durch Pipettieren (abgeschnittene 1 ml Spitze) dissoziiert

Crosslinking

- Es wurden 20 µl 37 % Formaldehyd (Endkonzentration 1 %) zu den ca. 700 µl Zellsuspension (durch die Zugabe von 4 Vorderhirne wird das Volumen um ca. 200 µl erhöht) gegeben
- Anschließend wurde 15 min bei RT inkubiert (Drehrad)

- 36 μ l 2,5 M Glycerin hinzugegeben (Endkonzentration 0,125 M)
- 5 min bei RT inkubiert (Drehrad)
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert
- Den Überstand entfernt und mit 500 μ l eiskaltem PBS gewaschen
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert
- Überstand entfernt

Lyse

- Zellpellet wurde in 500 μ l Zell-Lysis-Puffer aufgenommen und 15 min inkubiert
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert
- Zellpellet wurde in 700 μ l Zellkern-Lysis-Puffer aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert
- Weitere 300 μ l Zellkern-Lysis-Puffer wurden hinzugegeben

Sonifizierung

- Je 1 ml Zelllysat wurden auf 2 ml Reaktionsgefäße verteilt
- 40 Zyklen (1 Zyklus: 20 sec ON, 40 sec OFF) bei Sonifizierungsstärke 5 sonifiziert (Sonicator/Cell disruptor Model W185F; HeatSystems)
- 10 min bei 10.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert
- Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt
- 50 μ l wurden für die Input-Kontrolle weggefroren

Immunopräzipitation

- Mit Antikörper inkubierten Magnetkügelchen wurden 3x in 300 μ l 2 % BSA/PBS-Lösung gewaschen
- 450 μ l des sonifiziertem Chromatins wurden hinzugegeben
- Über Nacht bei 4 °C inkubiert (Drehrad)
- Überstand wurde verworfen
- 3x 5 min mit 500 μ l modifizierten RIPA-Puffer gewaschen (Drehrad)
- 2x 5 min mit 500 μ l TE Puffer gewaschen (Drehrad)

DNA-Elution

- 150 μ l Elutionspuffer wurden zu den Magnetkügelchen gegeben und bei 30 °C und 1000 rpm für 15 min inkubiert (Thermalmixer)

- Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt

Reverses Crosslinking

- Input-Kontrolle wurde aufgetaut und 400 µl Elutionspuffer hinzugegeben
- 4 µl Proteinase K [10 µg/µl] wurden zu den IP-Ansätzen und der Input-Kontrolle hinzugegeben
- 2h bei 56 °C im Thermomixer geschüttelt (800 rpm)

DNA-Aufreinigung

- IP-Ansätze: 150 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurden hinzugefügt
- Input-Kontrolle: 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurden hinzugefügt
- Gut gemischt und in Phase-Lock-Reaktionsgefäße überführt
- 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert
- Überstand in ein neues Phase lock-Reaktionsgefäß überführt
- IP-Ansätze: 150 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurden hinzugefügt
- Input-Kontrolle: 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurden hinzugefügt
- Gut gemischt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert
- Überstand in ein neues 1,5 ml DNA-LoBind-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt
- IP-Ansätze: 300 µl absoluten Ethanol und 5 µl Glycogen [20 µg/µl] wurden hinzugefügt
- Input-Kontrolle: 800 µl absoluten Ethanol und 5 µl Glycogen [20 µg/µl] wurden hinzugefügt
- 2 h bei -80 °C gefällt und 10 min bei 13.000 rpm (4 °C) zentrifugiert
- Pellet mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen und nochmals 10 min bei 13.000 rpm (4 °C) zentrifugiert
- Pellets getrocknet und in 50 µl EB-Puffer (Qiagen) gelöst
- DNA-Konzentration wurde mit dem Nano Drop bestimmt
- 0,5 und 1 µg Input-Kontroll-DNA wurden auf ein 1,5 % Agarose-Gel aufgetragen und 1 h bei 60 V aufgetrennt
- PCR-Analysen wurden mit spezifischen Primern (gerichtet gegen die zu untersuchenden Promotorsequenzen) durchgeführt

3.3.2 Immunfluoreszenz-Färbungen (IF)

Die Methode der Immunfluoreszenz-Färbung ermöglicht es bestimmte Proteine auf fixierten Gewebeschnitten nachzuweisen. Für die Detektion der Proteine wird zunächst ein primärer Antikörper gebunden. Dieser wird wiederum von einem sekundären Antikörper gebunden.

den, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. In der vorliegenden Arbeit wurden Immunfluoreszenz-Färbungen auf embryonalen Gehirnschnitten (Gefrierschnitte) durchgeführt.

Experimentelle Durchführung:

- Die mit embryonalen Gehirnschnitten versehenen Objektträger wurden aus dem -80 °C-Gefrierschrank genommen und 10 min bei RT aufgetaut
- Schnitte wurden in PBS gewaschen
- Inkubation in Block-Lösung für 1 h bei RT
- Primärantikörper wurde in Block-Lösung verdünnt (Foxp1 (m) und Chrna4 (rb) 1:800) und 2 h bei RT inkubiert
- 3x in PBS gewaschen
- Sekundärantikörper wurde in Block-Lösung verdünnt (Anti-Maus Alexa Fluor 488 (1:600) und Anti-Kaninchen Alexa Fluor 568 (1:800)) und 1h bei RT inkubiert
- 3x in PBS gewaschen
- Hoechst 33342 (Life Technologies) wurde 1:5000 in PBS verdünnt
- Schnitte wurden 3 min in Hoechst 33342 inkubiert
- 3x mit H₂O gewaschen
- Schnitte wurden getrocknet und mit Aqua Poly/Mount (Polysciences) eingedeckt
- Objektträger wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert
- Die Epifluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde mit dem Eclipse Ni-E Mikroskop und der DS-Qi1Mc Kamera des Nikon Imaging Centers in Heidelberg durchgeführt

3.4 Zell-basierte Methoden

3.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zellen wurden standardmäßig bei 37 °C und 5 % CO₂-Konzentration in Zellkulturflaschen mit Filterdeckel (Greiner) liegend inkubiert. Alle 3 Tage wurde der Mediumüberstand entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin von der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:2 in frischem DMEM-Medium (mit PenStrep, 10 % FCS, NEAA und L-Glutamin) neu ausgesät.

3.4.2 Transfektion

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in Antibiotika-freiem OPTIMEM-Medium ausgesät. Die ca. 50 - 70 % konfluenten Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 (Life Tech-

nologies) oder Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) nach Protokoll des Herstellers transfiziert.

3.4.3 Luciferase-Reporter-Gen-Assays

Der Luciferase-Reporter-Gen-Assay wurde zur Bestimmung der Genregulation angewendet. Hierfür wurden verschiedene Promotorregionen von *Pcdh17* und *Chrna4* vor die Firefly-Luciferase des pGL3 basic-Vektors (Promega) kloniert und zusammen mit einem *Foxp1*-Expressionsvektor (pcDNA3) in N1E-115 Zellen transfiziert. Während des Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase im Luminometer quantifiziert. Somit kann mit dieser Methode eine Aussage über den regulatorischen Einfluss der getesteten Promotorregionen in Anwesenheit von Foxp1 gemacht werden.

Experimentelle Durchführung:

- N1E-115-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät und mit Lipofectamine 2000 transfiziert, alle Transfektionen wurden in Triplikaten durchgeführt
- Als Transfektions- und Normalisierungskontrolle wurde das pRL-TK Renilla Luciferase-Konstrukt kotransfiziert
- 24 h nach Transfektion wurden Zellen mit PBS gewaschen
- Pro well wurden 100 µl Passive Lysis Buffer (Promega) hinzugegeben und 10 min bei RT lysiert
- Die 6-well-Platte wurde anschließend mindestens 1 h bei -80 °C eingefroren
- Für die Messungen im Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer (Berthold Technologies) wurden 50 µl des Zellextraktes verwendet
- Normalisierung der Firefly-Aktivität auf die Renilla-Aktivität

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Tierhaltung und Versuchstiere

Alle Tiere waren in einem spezifisch pathogenfreien (SPF) Tierstall der Universität Heidelberg (IBF) gehalten. Die Ernährung erfolgte *ad libitum* (Sattfütterung) mit handelsüblichen Pellets (58 % Kohlenhydrate, 33 % Protein und 9 % Fett) und sterilisiertem Wasser. Die Mäuse wurden in einem 12/12 Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

Die Durchführung der Tötung trächtiger Versuchstiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Eine genehmigte Tötungsanzeige lag dem Regierungspräsidiums Karlsruhe vor (Genehmigungs-

nummer: T-33/11). Die Entnahme von Embryonen erfolgte in Übereinstimmung mit dem europäischen und deutschen Gesetz zum Gebrauch von Labortieren.

Für die Generierung der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie wurde das Cre/loxP System angewendet. Die Gehirn-spezifische *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie wurde durch Kreuzung der *Foxp1*-floxed Mauslinie (erhalten von Dr. Phil Tucker) mit der *Nestin-Cre* Mauslinie (erhalten von Günther Schütz, DKFZ, Heidelberg) erreicht (Wang *et al.*, 2004; Tronche *et al.*, 1999). In dem Genom der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie wurden die Exons 11 und 12 (NM 053202.1) des *Foxp1*-Gens mit zwei loxP Sequenzen flankiert (direkte Wiederholungen) (Tronche *et al.*, 1999). Diese loxP-Sequenzen werden von der Cre-Rekombinase erkannt. Durch Exzision werden somit die Exons 11 und 12 des *Foxp1*-Gens deletiert.

3.5.2 Genotypisierung der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie

Zur Bestimmung der Genotypen der Mäuse bzw. Embryonen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie wurden Schwanzbiopsien verwendet.

Isolierung genomischer DNA aus Geweben zur Genotypisierung

- Gewebe wurde in 300 µl 1x Genotypisierungs-Puffer mit Proteinase K (100 ng/µl) aufgenommen
- 12 -16 h bei 56 °C (700 rpm) inkubiert
- Lysate wurden geschüttelt und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert

Genotypisierungs-PCR

- Die Genotypisierungs-PCRs wurden wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben mit der Taq DNA-Polymerase mit ThermoPol Puffer (New England Biolabs) durchgeführt. Die Bestimmung der Genotypen wurde anhand von zwei Reaktionen analysiert. Mit dem Primerpaar „Floxed for und Floxed rev“ wurde das *Foxp1*-Gen bzw. *Foxp1*-Transgen amplifiziert (Amplikongrößen = wt: 280 bp, Transgen: 380 bp). In einer weiteren Reaktion wurde das *Nestin-Cre*-Transgens mit dem Primerpaar „NesCre for und NesCre rev“ (Amplikongröße: 370 bp) amplifiziert.

3.5.3 Präparation von Embryonen und embryonalen Geweben

Die Entnahme der Embryonen aus dem Uterus des Muttertiers erfolgte nach zervikaler Dislokation. Während der gesamten Präparation waren die Embryonen in gekühltem PBS (in einer

Petrischale auf Eis). Die Gehirne der Embryonen wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops präpariert und anschließend je nach Verwendungszweck unterschiedlich behandelt.

ChIP-Experimente

Für ChIP-Experimente wurden Vorderhirne von Embryonen des Entwicklungsstadium E16 wie in 3.3.1 beschrieben bearbeitet.

RNA-Isolation

Die Isolation von RNA wurde von verschiedenen Embryonalstadien durchgeführt. Die Gehirne wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

RNA in situ Hybridisierungen und Immunfluoreszenz-Färbungen

Isolierte Gehirne wurden für 24 h in 4 % PFA bei 4 °C fixiert. Für weitere 24 h wurden die Gehirne in einer 30 % Sucrose-Lösung bei 4 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Gehirne in Einbettmedium (Jung) eingebettet und auf einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die Gehirne bei -80 °C gelagert.

3.5.4 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Anfertigung von Gefrierschnitten wurde mit Hilfe eines Kryotoms (CM 3050S, Leica) durchgeführt. Die Temperatur während des Schneidens betrug -19 °C und die Schnittdicke variierte zwischen 18 und 20 µm. Für die Gefrierschnitte wurden beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Scientific) verwendet. Bevor die Objektträger bei -80 °C weggefroren wurden, wurden diese für 30 min bei RT getrocknet.

3.6 Mikroskopie

Die Mikroskopie von Gehirnschnitten wurde mit dem motorisierten Eclipse Ni-E Auflichtmikroskop von Nikon am Nikon Imaging Center der Universität Heidelberg vorgenommen. Das Eclipse Ni-E ist mit einer Kamerasteuereinheit verbunden und wird über einen Computer bedient.

3.6.1 Durchlichtmikroskopie

Aufnahmen der *in situ* Hybridisierungen wurden mit dem Nikon PlanApo 10x (0.45 ∞ 0.17 WD. 4.0) Objektiv durchgeführt. Die Durchlichtaufnahmen wurden mit der DS-U3-Kamera (color) und mit Hilfe der NIS-Elements Software (Version 4; Nikon) aufgenommen.

3.6.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie der Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgte mit dem Nikon PlanApo 10x (0.45 ∞ 0.17 WD. 4.0) Objektiv. Die Aufnahmen von GFP (Green Fluorescent Protein), RFP (Red Fluorescent Protein) und DAPI erfolgten mit Hilfe der Nikon Digital Sight DS-U2-Kamera (schwarz/ weiß). Hierbei wurde die NIS-Elements Software (Version 4; Nikon) verwendet.

4

Ergebnisse

Zur Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Foxp1 im Gehirn während der Embryonalentwicklung wurden Microarray-Analysen in Zusammenarbeit mit Maria Muciek, Dr. Li Li und Dr. Carsten Sticht (Zentrum für Medizinische Forschung, Universitätsklinikum Mannheim) durchgeführt. Zunächst wurde ein Knockdown-Ansatz gewählt um Zielgene zu identifizieren. Hierfür wurde die endogene Expression von *FOXP1* mit „small interfering RNAs“ (siRNAs) in humanen SH-SY5Y-Zellen herunterreguliert. Später war auch eine konditionelle *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie verfügbar. Diese wurde für weitere Microarray-Analysen verwendet. Hierfür wurde RNA aus Vorderhirnen von wt und KO Embryonen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie eingesetzt. Dabei wurde das Entwicklungsstadium E16 gewählt, da aus vorangegangenen Studien bekannt war, dass zu diesem Zeitpunkt Foxp1 stark im Cortex, Striatum, Thalamus und Hippocampus exprimiert wird.

4.1 Identifizierung und Validierung des Zielgens *PCDH17*

4.1.1 Microarray-Analyse mit humanen Neuroblastoma-Zellen

Während die konditionelle *Foxp1*^{-/-}-Maus generiert wurde, habe ich einen *in vitro* Ansatz gewählt um Zielgene von FOXP1 zu identifizieren. Hierbei wurde die endogene Expression von *FOXP1* mit zwei *FOXP1*-spezifischen siRNAs in den humanen SH-SY5Y-Zellen herunterreguliert und mit Zellen verglichen, welche mit Kontroll-siRNA (scrambled siRNA) transfiziert waren. Diese Neuroblastoma-Zellen wurden gewählt, da sie bereits zuvor zur Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors FOXP2 verwendet wurden (Vernes *et al.*, 2008). SH-SY5Y-Zellen wurden mit den *FOXP1*-spezifischen siRNAs #1 und #3, sowie mit einer

Kontroll-siRNA mittels Lipofectamine RNAiMAX transfiziert. 48h nach der Transfektion wurde die RNA isoliert. Für die Microarray-Analyse wurden zwei unabhängige Experimente miteinander vereint. Die Expression der drei Ansätze (siRNA#1, siRNA#3 und Kontroll-siRNA) wurde auf Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix) verglichen. Anschließend wurden Gene nach festen Kriterien ausgewählt. Als potentielle Zielgene wurde nur Gene gewertet, die in beiden Knockdown-Ansätzen mit gleichem Trend und signifikant ($p < 0,05$) reguliert waren. Des Weiteren wurden nur Gene als potentielle Zielgene betrachtet, die eine x-fache Änderung aufwiesen, die größer als 1,3 bzw. kleiner als 0,8 war. Gene, die alle genannten Kriterien erfüllten, sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Microarray-Ergebnisse des Zielgen-Screenings mit RNA von *FOXP1* Knockdown-Experimenten in den humanen Neuroblastoma-Zellen SH-SY5Y.

Auflistung von 29 Genen, welche in SH-SY5Y-Zellen mit einer herunterregulierten *FOXP1* Expression (*FOXP1*-spezifische siRNAs #1 und #3) eine veränderte Expression aufwiesen. Alle aufgelisteten Gene waren in beiden Knockdown-Ansätzen (siRNA#1 und siRNA#3) signifikant ($p < 0,05$) reguliert und waren in beiden Ansätzen mit gleichem Trend reguliert (x-fache Änderung $> 1,3$ bzw. $< 0,8$).

Gensymbol	Genname	x-fache Änderung (siRNA#1)	$-\log_{10}$ (p-Wert) (siRNA#1)	x-fache Änderung (siRNA#3)	$-\log_{10}$ (p-Wert) (siRNA#3)
<i>DUSP6</i>	<i>Dual specificity phosphatase 6</i>	1,6	28,9	1,5	24,3
<i>H19</i>	<i>H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)</i>	1,5	6,1	1,5	7,2
<i>TOMM20</i>	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)</i>	1,5	8,3	1,5	8,2
<i>DPYSL3</i>	<i>Dihydropyrimidinase-like 3</i>	1,4	16,2	1,3	14
<i>CALU</i>	<i>Calumenin</i>	1,3	20,6	1,6	38
<i>CHGB</i>	<i>Chromogranin B (secretogranin 1)</i>	1,3	6,2	1,4	8,1
<i>HPCAL1</i>	<i>Hippocalcin-like 1</i>	1,3	15,4	1,3	15
<i>VLDLR</i>	<i>Very low density lipoprotein receptor</i>	1,3	5,3	1,3	4,7
<i>CDO1</i>	<i>Cysteine dioxygenase, type 1</i>	0,8	5,7	0,8	5,9
<i>OSBPL6</i>	<i>Oxysterol binding protein-like 6</i>	0,8	4,8	0,8	4,5
<i>FAM40B</i>	<i>Family with sequence similarity 40, member B</i>	0,8	5,4	0,8	5,4
<i>MID1</i>	<i>Midline 1 (Opitz/BBB syndrome)</i>	0,8	5,6	0,7	11,4
<i>NID2</i>	<i>Nidogen 2 (osteonidogen)</i>	0,8	4,1	0,7	7,8
<i>HERC5</i>	<i>Hect domain and RLD 5</i>	0,8	5,5	0,7	8,7
<i>PRICKLE1</i>	<i>Prickle homolog 1 (Drosophila)</i>	0,8	14,8	0,8	9,2
<i>CTSL2</i>	<i>Cathepsin L2</i>	0,8	4,8	0,8	5,9
<i>PMP22</i>	<i>Peripheral myelin protein 22</i>	0,8	6,6	0,8	5,8
<i>PCDH17</i>	<i>Protocadherin 17</i>	0,8	9,6	0,7	11,4
<i>ZMAT3</i>	<i>Zinc finger, matrin type 3</i>	0,8	5,2	0,7	7,6
<i>ST6GALNAC5</i>	<i>ST6 (α-N-acetyl-neuraminy-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylglactosaminide α-2,6-sialyltransferase 5</i>	0,8	4,5	0,7	6
<i>MATN3</i>	<i>Matrilin 3</i>	0,8	4,1	0,7	7
<i>EAF1</i>	<i>ELL associated factor 1</i>	0,7	8,9	0,8	4,6
<i>NPTX2</i>	<i>Neuronal pentraxin II</i>	0,7	7,2	0,8	6,7
<i>CHST15</i>	<i>Carbohydrate (N-acetylglactosamine 4-sulfate 6-O) sulfotransferase 15</i>	0,7	7,3	0,7	7,2
<i>TSPAN8</i>	<i>Tetraspanin 8</i>	0,7	5,5	0,7	6,3
<i>FOXC1</i>	<i>Forkhead box C1</i>	0,7	13,9	0,8	5,2
<i>GLT8D2</i>	<i>Glycosyltransferase 8 domain containing 2</i>	0,7	9,3	0,6	11,2
<i>HTR2B</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B</i>	0,6	7,3	0,6	7,3
<i>FOXP1</i>	<i>Forkhead box P1</i>	0,6	11,4	0,5	13,6

Die in Tabelle 4.1 aufgelisteten potentiellen Zielgene wurden mittels qPCR-Experimente validiert. Bei der Validierung der 28 potentiellen Zielgene wurde jeweils die RNA verwendet, welche für die Microarray-Analyse genommen wurde, sowie RNA von zwei weiteren unabhängigen Knockdown-Experimenten. Für die geplanten Experimente mit Material von Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie war es von Bedeutung, dass die Regulation der potentiellen Zielgene nicht nur in einer humanen, sondern auch in einer murinen Zelllinie gezeigt werden konnte. Daher wurden Knockdown-Studien auch in der murinen Neuroblastoma-Zelllinie N1E-115 durchgeführt. Dafür wurde die Expression von *Foxp1* in diesen Zellen mit den siRNAs #2 und #3 herunterreguliert. Zur weiteren Validierung der potentiellen Zielgene wurden qPCR-Experimente mit RNA von drei unabhängigen Knockdown-Studien der N1E-115-Zellen ausgewertet. Hier zeigte sich, dass die Expression des potentiellen Zielgens Protocadherin 17 (*PCDH17*) in den humanen SH-SY5Y-Zellen und in den murinen N1E-115-Zellen reguliert ist.

4.1.2 Bestätigung des potentiellen Zielgens *PCDH17*

Die Expression des aus den Microarray-Analysen (4.1.1) hervorgegangenen Zielgens *PCDH17* wird durch eine verringerte *FOXP1*-Expression in den humanen SH-SY5Y- und in den murinen N1E-115-Zellen herunterreguliert (Abb. 4.1 A+B). Die Knockdown-Studien in den SH-SY5Y-Zellen zeigten, dass die Expression von *PCDH17* in Zellen, welche mit den siRNAs #1 und #3 transfiziert wurden, signifikant um ca. 50 % herunterreguliert waren. Weitere Untersuchungen in den murinen N1E-115-Zellen führten zu einem ähnlichen Ergebnis. Hier konnte gezeigt werden, dass durch eine herunterregulierte *Foxp1*-Expression mit den siRNAs #2 und #3 die Expression von *Pcdh17* beeinflusst wird. So wird in Zellen mit einem *Foxp1*-Knockdown die Expression von *Pcdh17* um ca. 30 % herunterreguliert.

Pcdh17 ist ein neuronales Zell-Adhäsions-Protein. In vorangegangenen Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass *Pcdh17* sowohl im menschlichen, als auch im murinen Gehirn exprimiert ist (Abrahams *et al.*, 2007). Um eine Regulation im murinen Gehirn nachweisen zu können, wurden daher in dieser Arbeit Vorderhirne von Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie entnommen und daraus die RNA isoliert. Nach der Umschreibung der RNA in cDNA wurden qPCR-Experimente durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass *Foxp1* das Zielgen *Pcdh17* während der embryonalen Gehirnentwicklung reguliert (Abb. 4.1 C). An allen getesteten Embryonalstadien (E13: ein Wurf; E15: ein Wurf und E16: vier Würfe) ist die Expression von *Pcdh17* in den Vorderhirnen der KO-Embryonen um ca. 20 % herunterreguliert. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass *Foxp1* und *Pcdh17* an den Entwicklungstagen E13, E15 und E16 koexprimiert sind.

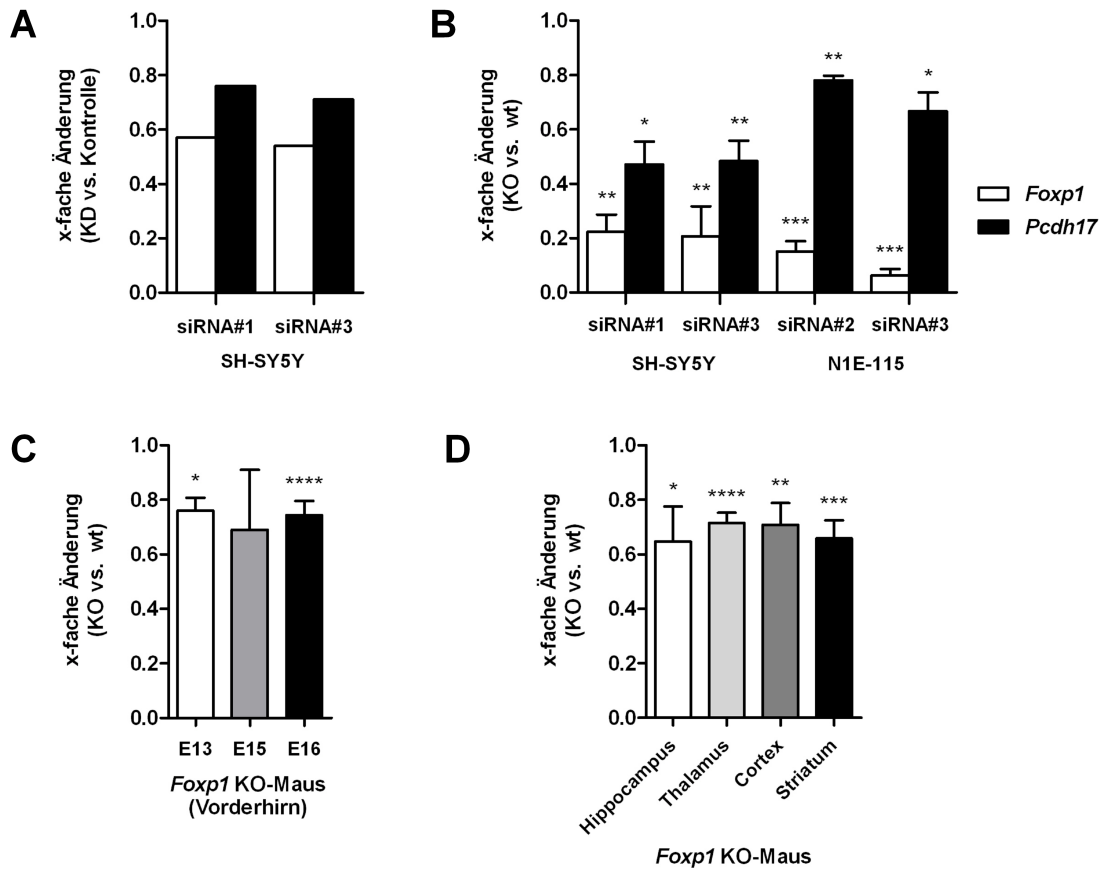


Abbildung 4.1: Regulatorische Effekte von FOXP1 auf PCDH17.

A: Microarray-Messungen der Expressionslevel von *FOXP1* und *PCDH17* in den SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen wurden mit *FOXP1*-spezifischen siRNAs (#1 und #3) und Kontroll-siRNAs transfiziert. RNA von zwei unabhängigen Knockdown-Experimenten wurde miteinander vereint. Das Expressionslevel der Knockdown-Ansätze wurde mit dem der Kontroll-Zellen verglichen. Weiße Balken: *FOXP1*, schwarze Balken: *PCDH17*. B: qPCR-Analysen zur Bestätigung der Microarray-Ergebnisse. Expression von *FOXP1* und *PCDH17* in SH-SY5Y- und N1E-115-Zellen mit siRNA-induziertem *FOXP1* Knockdown (drei unabhängige Experimente). Weiße Balken: *FOXP1*, schwarze Balken: *PCDH17*. C: Expression von *Pcdh17* in Vorderhirnen von Embryonen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie der Entwicklungsstadien E13, E15 und E16. Weißer Balken: E13 (ein Wurf), grauer Balken: E15 (ein Wurf), schwarzer Balken: E16 (vier Würfe). D: qPCR-Analyse zur Identifizierung der Gehirnregion, in denen die Regulation von *Pcdh17* im Gehirn stattfindet. KO vs. wt-Vergleich von Embryonen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungsstadiums E16 (zwei Würfe). Weißer Balken: Hippocampus; hellgrauer Balken: Thalamus; dunkelgrauer Balken: Cortex; schwarzer Balken: Striatum. B-D: Balken repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehlern.

Um herauszufinden, in welcher Region des Vorderhirns die Regulation stattfindet, wurde der Hippocampus, der Thalamus, der Cortex und das Striatum aus Gehirnen von Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie (zwei Würfe) des Entwicklungsstadiums E16 präpariert. Nach Isolierung der RNA wurde die daraus umgeschriebene cDNA für qPCR-Experimente verwendet. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass *Foxp1* die Expression von *Pcdh17* in allen getesteten Gehirnregionen signifikant reguliert (Abb. 4.1 D). Diese Ergebnisse stimmen mit den Messungen überein, die aus den Experimenten mit Material von Vorderhirnen von Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie hervorgingen (Abb. 4.1 C). Hier war die Expression von *Pcdh17* in den KO-Embryonen ca. 20 % niedriger als in den wt-Embryonen.

Somit konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass in Zellen mit einer verringerten *Foxp1*-Expression die Expression von *Pcdh17* herunterreguliert ist.

4.1.3 Expression von *Foxp1* und *Pcdh17* während der embryonalen Gehirnentwicklung

Um die Koexpression von *Foxp1* und *Pcdh17* auf embryonalen Gehirnschnitten zu zeigen, wurden RNA *in situ* Hybridisierungen (ISH) durchgeführt. Diese Methode wurde gewählt, da es keinen Anti-*Pcdh17*-Antikörper kommerziell erhältlich gibt, der *Pcdh17* spezifisch auf Gehirnschnitten erkennt. Für die ISH wurden Digoxigenin-markierte sense- und antisense-RNA-Sonden gegen die mRNA-Transkripte von *Foxp1* und *Pcdh17* hergestellt. Für ISH-Experimente wurden Gefrierschnitte von wt-Gehirnen der embryonalen Stadien E13, E15 und E16 angefertigt.

Zu Beginn wurden die sense-RNA-Sonden getestet. Diese dienten als Negativkontrolle. ISH mit den sense-RNA-Sonden führten zu keiner Färbung der Gehirnschnitte (siehe Anhang 5.3.1). Somit kommt es bei Anwendung der sense-RNA-Sonden zu keiner Bindung von mRNA-Transkripten.

Anschließend wurden ISH auf den angefertigten Gehirnschnitten der Entwicklungsstadien E13, E15 und E16 mit den *Foxp1*- und *Pcdh17*-antisense-RNA-Sonden durchgeführt. Sowohl *Foxp1*, als auch *Pcdh17* sind an allen getesteten embryonalen Tagen im Gehirn exprimiert (Abb. 4.2 A+B). In Abbildung 4.2 A ist die Koexpression von *Foxp1* und *Pcdh17* im Striatum von E13 bis E16 zu sehen (siehe Pfeile). Am Entwicklungstag E15 sind *Foxp1* und *Pcdh17* zudem im Cortex, Hippocampus und Thalamus koexprimiert (Abb. 4.2 B; siehe Pfeile). Auch an E16 ist die Expression von *Foxp1* und *Pcdh17* im Hippocampus überlappend.

Aus den Ergebnissen der ISH geht hervor, dass *Foxp1* und *Pcdh17* in allen Gehirnarealen koexprimiert sind, von denen in vorangegangenen Studien gezeigt wurde, dass *Foxp1* die Expression von *Pcdh17* reguliert (4.1.2). Zu den Gehirnregionen, in denen die Koexpression und die Regulation bestätigt werden konnte, gehören der Cortex, das Striatum und der Thalamus. Dies sind Gehirnareale, die bei der Verarbeitung von Kognition und Sprache involviert sind.

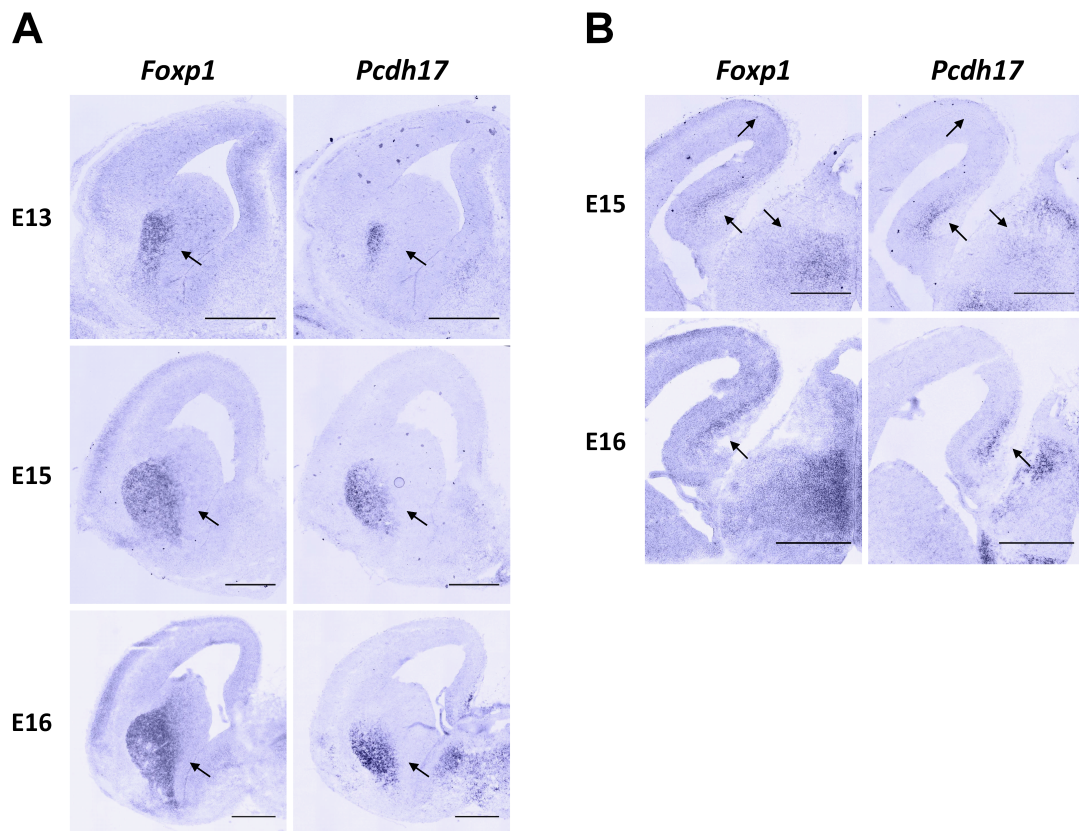


Abbildung 4.2: Expression von *Foxp1* und *Pcdh17* während der embryonalen Gehirnentwicklung. RNA *in situ* Hybridisierungen auf wt Gehirnschnitten der Entwicklungsstadien E13, E15 und E16. A: Die Expression von *Foxp1* und *Pcdh17* ist von E13 bis E16 überlappend im Striatum. B: An Tag E15 sind *Foxp1* und *Pcdh17* zudem im Thalamus, Cortex und Hippocampus koexprimiert. Am embryonalen Entwicklungstag 16 ist die Expression von *Foxp1* und *Pcdh17* im Hippocampus weiterhin überlappend. Die Maßstabsbalken entsprechen 500 μm .

4.1.4 Expression von *FOXP1* und *PCDH17* im adulten humanen Gehirn

In einer Expressionsstudie humaner Gehirnareale sollte sichergestellt werden, dass *FOXP1* und *PCDH17* auch im menschlichen Gehirn koexprimiert sind. Die hierfür verwendete RNA wurde von Ambion erworben. Nach Umschreibung der RNA in cDNA, wurde die Expression im adulten frontalen Cortex, Hippocampus, Thalamus, Amygdala und Cerebellum analysiert. Es wurden semiquantitative-PCRs mit Primer durchgeführt, die an das humane *FOXP1* und *PCDH17* binden (Abb. 4.3). Als Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen *ADP-Ribosylation Faktor 1* (*ARF1*) gemessen. Insgesamt wurden 35 Zyklen angewendet um die Expression zu detektieren.

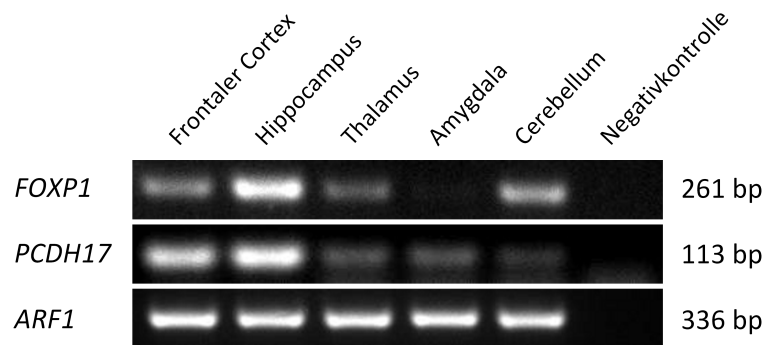


Abbildung 4.3: Expression von *FOXP1* und *PCDH17* im adulten humanen Gehirn. Semiquantitative PCR zur Analyse der Expression von *FOXP1* und *PCDH17* im humanen Gehirn (Frontaler Cortex, Hippocampus, Thalamus, Amygdala und Cerebellum). Als Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen *ARF1* gemessen. Es wurden 35 Zyklen angewendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass *FOXP1* und *PCDH17* im frontalen Cortex, Hippocampus, Thalamus und Cerebellum des adulten menschlichen Gehirns koexprimiert sind und beide die stärkste Expression im Hippocampus aufweisen. Somit konnte eine Koexpression von *FOXP1* und *PCDH17* im Cortex, Hippocampus und Thalamus des murinen (Abb. 4.2) sowie des humanen Gehirns gezeigt werden.

4.1.5 Etablierung der ChIP-Methode

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) eignet sich zur Identifizierung von Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren in den Promotorregionen von Zielgenen. Wie die bisherigen Ergebnisse der Experimente mit Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie gezeigt haben, reguliert *Foxp1* die Expression von *Pcdh17* im Gehirn. Daher wurde die ChIP-Methode mit Chromatin von E16 Vorderhirne von wt-Mausembryonen etabliert.

Die Sonifizierung des Chromatins wurde mit dem Cell disruptor Model W185F durchgeführt. Obwohl dies ein manuelles Sonifiziergerät ist, wurden hiermit bessere Resultate erzielt, als mit den automatischen Sonifizierern Covaris S220 und Diagenode Bioruptor, die ebenfalls im Zuge der Etablierung des ChIP-Protokolls getestet wurden. Durch die Anwendung von 40 Zyklen (1 Zyklus: 20 sec ON, 40 sec OFF) wurde DNA in 100 bis 10.000 bp Fragmente zerkleinert. Die meisten der DNA-Fragmente hatten jedoch eine Größe von 200 bis 1000 bp (Abb. 4.4).

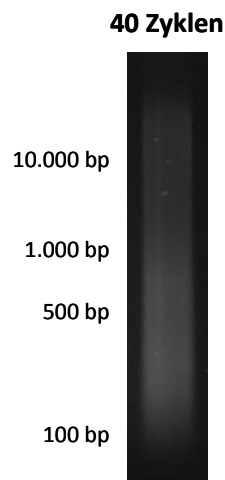


Abbildung 4.4: DNA-Fragmentgrößen der verwendeten sonifizierten DNA.

Dargestellt sind die DNA-Fragmente nach der Sonifizierung des Chromatins durch Anwendung von 40 Zyklen. Die Größe der Fragmente variiert von 100 bis 10.000 bp, wobei die meisten Fragmente zwischen 200 bis 1000 bp groß waren.

Für die Etablierung der ChIP-Methode wurde ein Anti-Polymerase II-Antikörper (Pol II) verwendet. Dieser Antikörper wurde bereits zur Etablierung der ChIP-Methode eingesetzt (persönliche Mitteilung von Mathieu Gabut; Gabut *et al.* (2011)). Als Negativkontrolle wurde humanes IgG verwendet.

Der Erfolg einer durchgeführten ChIP wurde mittels qPCR kontrolliert. Hierbei wurde überprüft, ob endogenes Pol II-Protein immunopräzipitiert wurde und somit DNA-Fragmente von Zielgenen angereichert wurden. Bei der qPCR-Analyse wurden die TATA-Box-Sequenzen der Housekeeping-Gene *Actin, beta (Actb)* und *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (Hprt1)* gemessen. Als Kontrolle wurde ca. 2 kb *upstream* von den TATA-Boxen der beiden Gene eine Kontroll-Region gemessen. Eine erfolgreiche ChIP ist in Abbildung 4.5 zusehen. Die TATA-Box-Sequenzen von *Actb* und *Hprt1* (weiß) sind im Vergleich zu der Kontroll-Region (schwarz) angereichert. Alle Messungen der Pol II-ChIP wurde auf Messungen der IgG-ChIP normalisiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die ChIP-Methode erfolgreich mit dem Anti-Pol II-Antikörper etabliert wurde.

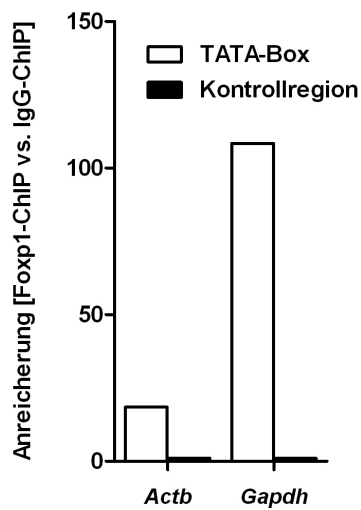


Abbildung 4.5: Anreicherung von TATA-Box DNA-Fragmenten in der Pol II-ChIP.

Actb und *Gapdh* TATA-Box DNA-Fragmente sind im Vergleich zu der Kontrollregion angereichert. Alle Messungen, die aus der Pol II-ChIP hervorgingen, wurden auf IgG-ChIP Messungen normalisiert und mit einer Kontrollregion verglichen. Weiße Balken: Promotorregionen von *Actb* und *Gapdh*; schwarze Balken: Kontrollregion.

4.1.6 Identifizierung von Foxp1 Bindungsstellen in der Promotorregion von *Pcdh17*

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Foxp1 die Expression von *Pcdh17* reguliert. Um zu untersuchen, ob diese Regulation direkt ist, wurde die Sequenz der 10 kb *upstream*-Region vor dem Transkriptionsstart von *Pcdh17* auf Bindungsstellen von Foxp1 analysiert (Wang *et al.*, 2003). Insgesamt wurden 13 Sequenzabschnitte gefunden, in denen Bindungsstellen von Foxp1 *in silico* vorkommen (Abb. 4.6 A). Um herauszufinden, ob Foxp1 einen dieser Sequenzabschnitte der Promotorregion von *Pcdh17* bindet, wurden ChIP-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde mittels eines Anti-Foxp1-Antikörpers das endogene Foxp1-Protein aus Vorderhirnen von wt-Embryonen des Entwicklungstages 16 immunopräzipitiert und die gebundene DNA mittels der qPCR-Methode analysiert. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass Foxp1 einen spezifischen Sequenzabschnitt (Sequenzabschnitt 12; mm10, chr14:84437663-84438292) der Promotorregion von *Pcdh17* bindet (Abb. 4.6 B+C). Es konnte in drei unabhängigen ChIP-Experimenten gezeigt werden, dass dieser Sequenzabschnitt in den Foxp1-ChIPs 3- bis 7-fach (weiße Balken) im Vergleich zu der Kontroll-Region (schwarze Balken) angereichert war. Alle Messungen wurden auf Messungen der IgG-ChIP normalisiert. Der Sequenzabschnitt "12" der Promotorregion von *Pcdh17* ist 629 bp lang, beinhaltet acht Bindungsstellen von Foxp1 und liegt ca. 8 kb *upstream* vor dem Transkriptionsstart. Die Konservierung dieser Sequenz zwischen *Mus musculus* (mm10) und *Homo sapiens* (hg19) liegt bei 77,6 %.

Somit konnte mithilfe der ChIP-Methode eine direkte Interaktion zwischen Foxp1 und der Promotorregion von *Pcdh17* gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in den vorherigen Ergebnissen gezeigte Regulation direkt ist.

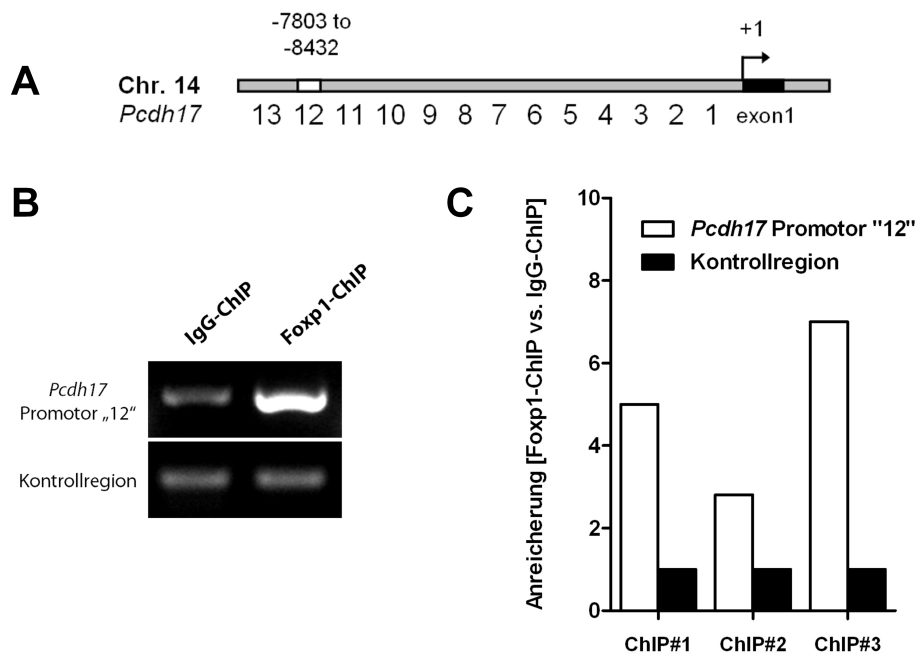


Abbildung 4.6: Identifizierung von Foxp1-Bindungsstellen in der Promotorregion von *Pcdh17*. A: Schema der Promotorregion von *Pcdh17*. Zahlen stellen Fragmente unterschiedlicher Längen dar, die potentielle Foxp1-Bindungsstellen enthalten. Diese Fragmente wurden in den Foxp1-ChIP Ansätzen auf DNA-Anreicherung überprüft. Die weiße Box repräsentiert die Region, welche in der Foxp1-ChIP angereichert war. B: Die semiquantitative PCR der Promotorregion „12“ von *Pcdh17* und der Kontrollregion wurde mit DNA von Foxp1- und IgG-ChIP Experimenten durchgeführt. Alle Messungen, die aus der Foxp1-ChIP hervorgingen, wurden auf IgG-ChIP-Messungen normalisiert und mit einer Kontrollregion verglichen (drei unabhängige Experimente). Weiße Balken: Promotorregion „12“ von *Pcdh17*; schwarze Balken: Kontrollregion. C: DNA-Anreicherung des Fragmentes „12“ in der Promotorregion von *Pcdh17*.

4.1.7 Überprüfung der funktionellen Relevanz der Promotorregion „12“ von *Pcdh17*

Zur Analyse der funktionellen Relevanz der Bindung von Foxp1 an die Promotorregion „12“ von *Pcdh17* wurden Luciferase-Reporter-Assays durchgeführt. Hierfür wurde die Promotorregion „12“ von *Pcdh17* vor die Firefly-Luciferase des pGL3 basic-Vektors kloniert. Für die Luciferase-Reporter-Assays wurden murine N1E-115 Zellen verwendet. Zur Normalisierung wurde der pRL-TK-Vektor, welcher für die Renilla-Luciferase kodiert, kotransfiziert. Um das Regulationspotential der Promotorregion „12“ von *Pcdh17* zu analysieren, wurden die Luciferaseaktivität mit und ohne Foxp1-Überexpression gemessen.

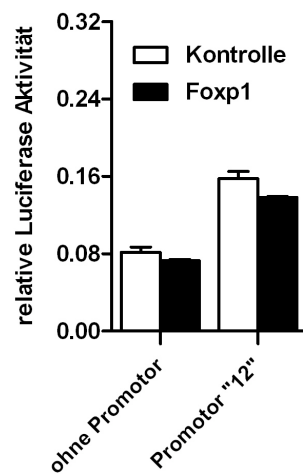


Abbildung 4.7: Luciferase-Assays zur Analyse der funktionellen Relevanz der Promotorregion „12“ von *Pcdh17*. Balken repräsentieren die relative Luciferase-Aktivität. Luciferase-Aktivität (pGL3 basic) wurde auf die Renilla-Aktivität (pRL-TK) normalisiert. Weiß: Kontrolle; schwarz: Foxp1. Balken repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehlern.

In Abbildung 4.7 ist die Aktivität der Firefly-Luciferase von pGL3 basic-Vektoren mit und ohne die Promotorsequenz „12“ von *Pcdh17* dargestellt. Die weißen Balken repräsentieren Ansätze ohne eine Foxp1-Überexpression (Kontrolle) und die schwarzen Balken zeigen Ansätze mit einer Foxp1-Überexpression. Die Ergebnisse des Luciferase-Reporter-Assays zeigen, dass der Sequenzabschnitt „12“ allein nicht ausreicht, um die Expression der Firefly-Luciferase des pGL3 basic-Vektors zu regulieren (zwei unabhängige Experimente). Für die Aktivierung der Firefly-Luciferase-Aktivität scheint das Zusammenwirken mehrerer regulatorischer Bereiche und/ oder in diesem Experiment fehlende Kofaktoren notwendig zu sein.

4.2 Identifizierung und Validierung des Zielgens *Chrna4*

4.2.1 Microarray-Analyse mit RNA von Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungsstadium E16

Zur Identifizierung weiterer Zielgene von Foxp1 wurde ein zweites Zielgen-Screening durchgeführt. Dafür wurde RNA aus Vorderhirnen von Embryonen des Entwicklungsstages 16 der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie isoliert. Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass die Expression von Foxp1 nach 13 Tagen embryonaler Entwicklung im Gehirn beginnt. In diesem Entwicklungsstadium ist Foxp1 im Striatum und Cortex exprimiert. Im Verlauf der embryonalen Entwicklung wird die Expression im Striatum und Cortex stärker und beginnt im Hippocampus und Thalamus. Am Entwicklungstag E16 ist Foxp1 stark im Striatum, Cortex, Hippocampus und Thalamus exprimiert. Da zu diesem Zeitpunkt die Foxp1-Expression zum ersten Mal während der embryonalen Gehirnentwicklung stark ausgeprägt ist, wurde dieses Stadium gewählt, um ein genomweites Zielgen-Screening durchzuführen.

Insgesamt wurde die Expression von drei KO-Embryonen mit der Expression von drei wt-Embryonen aus zwei Würfen verglichen. Aus dem ersten Wurf wurden zwei KO- und zwei wt-Embryonen und aus dem zweiten Wurf ein KO- und ein wt-Embryo verwendet. Die RNA aus den Vorderhirnen wurde mit TRIzol isoliert und entsprechend für die Hybridisierung für die Mouse Gene 2.0 ST Arrays (Affymetrix) aufbereitet. Für die Auswahl potentieller Zielgene wurden folgende Kriterien angewendet: Es wurden ausschließlich Gene ausgewählt, die in allen KO vs. wt-Vergleichen mehr als 1,2-fach reguliert waren und einen p-Wert kleiner als 0,05 aufwiesen. In Tabelle 4.2 sind alle potentiellen Zielgene aufgelistet, die diese Kriterien erfüllten. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte aller KO vs. wt-Vergleiche.

Für die Validierung der 23 potentiellen Zielgene wurden qPCR-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde RNA in cDNA umgeschrieben und für qPCR-Analysen eingesetzt. Neben den zwei Würfen, die für das Microarray-Screening verwendet wurden, wurden zwei zusätzliche Würfe überprüft. Insgesamt wurden somit 20 KO vs. wt-Vergleiche für die Validierung der Microarray-Daten verwendet. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass die Expression der potentiellen Zielgene stark schwankt. So zeigte sich, dass beispielsweise der Transkriptionsfaktor Tcf7l2 in den Microarray-Experimenten die höchste differentielle Genexpression aufwies, die jedoch in weiteren Untersuchungen unterschiedlicher Würfe nicht bestätigt werden konnte. Bei den durchgeführten qPCR-Experimenten wurden bei fast allen Genen starke Schwankungen zwischen den Würfen beobachtet. Jedoch konnte bei der Validierung für das *Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-4*-Gen (*Chrna4*) in allen Würfen eine konstante Regulierung gezeigt werden. Somit stellt *Chrna4* ein interessantes Zielgen von Foxp1 dar.

Tabelle 4.2: Microarray-Ergebnisse des Zielgen-Screenings mit RNA von Embryonen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungsstadiums E16.

Auflistung von 23 Genen, welche in allen Gehirnen von KO-Embryonen (n=3; 2 Würfe) im Vergleich zu den wt-Embryonen (n=3; 2 Würfe) differentiell exprimiert waren (x-fache Änderung >1,2). Alle aufgelisteten Gene waren signifikant (p<0,05) reguliert und sind als Mittelwert der fünf KO vs. wt-Vergleiche dargestellt.

Gensymbol	Genname	x-fache Änderung	-log10 (p-Wert)
<i>Tcf7l2</i>	<i>Transcription factor 7 like 2, T cell specific, HMG box</i>	2,9	31,3
<i>Zfx3</i>	<i>Zinc finger homeobox 3</i>	1,6	18,2
<i>Chrna4</i>	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4</i>	1,6	23,2
<i>Syt13</i>	<i>Synaptotagmin XIII</i>	1,4	9,2
<i>Irx2</i>	<i>Iroquois related homeobox 2 (Drosophila)</i>	1,4	5,5
<i>Esrrg</i>	<i>Estrogen-related receptor gamma</i>	1,3	9,4
<i>Hap1</i>	<i>Huntingtin-associated protein 1</i>	1,4	11,3
<i>Chrna3</i>	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3</i>	1,3	8,6
<i>Cdh18</i>	<i>Cadherin 18</i>	1,3	8,6
<i>Sfrp2</i>	<i>Secreted frizzled-related protein 2</i>	1,2	3,9
<i>Rcan2</i>	<i>Regulator of calcineurin 2</i>	1,2	7,7
<i>Kndc1</i>	<i>Kinase non-catalytic C-lobe domain (KIND) containing 1</i>	1,3	7,1
<i>Pcdh19</i>	<i>Protocadherin 19</i>	1,2	3,0
<i>Slc12a5</i>	<i>Solute carrier family 12, member 5</i>	1,3	10,9
<i>Mmp2</i>	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	1,2	3,5
<i>Pnoc</i>	<i>Prepronociceptin</i>	1,1	2,2
<i>Nefh</i>	<i>Neurofilament, heavy polypeptide</i>	1,1	1,8
<i>Hoxb8</i>	<i>Homeobox B8</i>	1,1	1,5
<i>Mtap1a</i>	<i>Microtubule-associated protein 1 A</i>	1,2	5,3
<i>Gabra3</i>	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 3</i>	1,2	7,9
<i>Kcna5</i>	<i>Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5</i>	1,2	1,6
<i>Kcnd2</i>	<i>Potassium voltage-gated channel, shal-related family, member 2</i>	1,2	9,0
<i>Ablim3</i>	<i>Actin binding LIM protein family, member 3</i>	1,2	8,9
<i>Foxp1</i>	<i>Forkhead box P1</i>	0,4	22,3

4.2.2 Bestätigung des potentiellen Zielgens *Chrna4*

In allen KO vs. wt-Vergleichen der vier Würfe der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie konnte eine veränderte Expression von *Chrna4* gezeigt werden. Der Mittelwert aller Vergleiche zeigt, dass am Entwicklungstag E16 die Expression von *Chrna4* in den Gehirnen der KO-Embryonen, im Vergleich zu wt-Embryonen 1,45-fach erhöht (p<0,05) ist (Abb. 4.8 B). Somit konnten die Ergebnisse der Microarray-Messungen (Abb. 4.8 A) bestätigt werden. Zur genaueren Untersuchung der Regulation wurde die Expression von *Chrna4* in Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des embryonalen Stadiums E15 mittels der qPCR-Methode untersucht. Aus diesen Messungen ging hervor, dass *Foxp1* auch am Entwicklungstag E15 die Expression von *Chrna4* beeinflusst. So ist die Expression von *Chrna4* in den Gehirnen der KO-Embryonen, im Vergleich zu wt-Embryonen 1,57-fach erhöht (p<0,05). Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass bereits am Entwicklungstag E15 neben *Foxp1* auch *Chrna4* im Vorderhirn exprimiert ist.

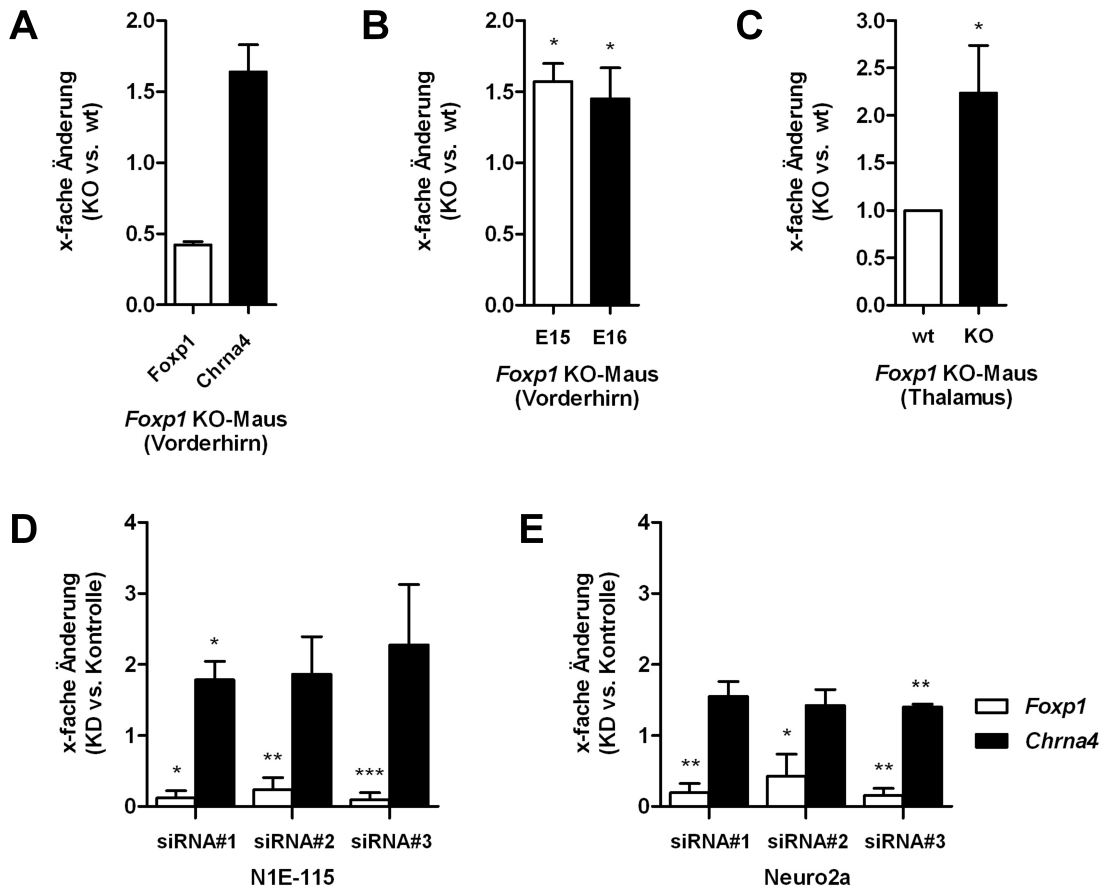


Abbildung 4.8: Regulatorische Effekte von *Foxp1* auf *Chrna4*.

A: Microarray-Messungen der Expressionslevel von *Foxp1* und *Chrna4* in Vorderhirnen von Embryonen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungsstadiums E16 (2 Würfe: 3 wt und 3 KO). Weiße Balken: *Foxp1*, schwarze Balken: *Chrna4*. B: qPCR-Analysen zur Bestätigung der Microarray-Ergebnisse. Expression von *Chrna4* in Vorderhirnen von Embryonen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie der Entwicklungsstadien E15 und E16. Weißer Balken: E15 (ein Wurf), schwarzer Balken: E16 (vier Würfe). C: qPCR-Analyse zur Identifizierung der Gehirnregion, in denen die Regulation von *Chrna4* im Gehirn stattfindet. KO vs. wt-Vergleich von Embryonen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungsstadiums E16 (zwei Würfe). Weißer Balken: wt; schwarzer Balken: KO. D+E: Expression von *Foxp1* und *Chrna4* in N1E-115- und Neuro2a-Zellen mit siRNA-induziertem *Foxp1* Knockdown (3 *Foxp1*-spezifischen siRNAs; drei unabhängige Experimente). Weiße Balken: *Foxp1*, schwarze Balken: *Chrna4*. A-E: Balken repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehlern.

Um herauszufinden, in welchen Gehirnregionen diese Regulation am Entwicklungstag E16 stattfindet, wurden das Striatum, Cortex, Hippocampus und Thalamus aus Gehirnen von Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie (zwei Würfe) präpariert. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde dann für qPCR-Experimente verwendet. Durch die Ergebnisse dieser Experimente konnte aufgeklärt werden, dass eine Regulation von *Chrna4* durch *Foxp1* im Thalamus stattfindet (Abb. 4.8 C). Im Thalamus der KO-Embryonen ist die Expression von *Chrna4* im Vergleich zu den wt-Gehirnen 2,2-fach erhöht ($p < 0,05$). Des Weiteren konnte die Regulation von *Chrna4* in *in vitro*-Experimenten in zwei murinen Neuroblastoma-Zelllinien bestätigt werden. Sowohl in den N1E-115-, als auch in den Neuro2a-Zellen wurde die endogene Expression von *Foxp1* mit drei *Foxp1*-spezifischen siRNAs herunterreguliert. Zudem wurde eine Kontroll-siRNA verwendet, mit der Expression verglichen wurde, um Off-Target-Effekte auszuschließen. In beiden Zelllinien konnte in drei unabhängigen Experimenten gezeigt werden, dass eine reprimierte *Foxp1*-Expression zu einem Anstieg der *Chrna4*-Expression führt (Abb. 4.8 D+E). Dabei wird die *Chrna4*-Expression in den N1E-115-Zellen ca. 2-fach und in den Neuro2a-Zellen ca. 1,5-fach erhöht. Diese Ergebnisse bestätigen somit den in den Gehirnen der KO-Embryonen gezeigten inhibitorischen Effekt von *Foxp1* auf die *Chrna4*-Expression.

4.2.3 Expression von *Foxp1* und *Chrna4* während der embryonalen Gehirnentwicklung

Durch Immunfluoreszenz-Färbungen sollte sichergestellt werden, dass *Foxp1* und *Chrna4* im Thalamus während der Embryonalentwicklung exprimiert sind. Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden auf embryonalen Gehirnschnitten der Entwicklungsstadien E14 und E16 durchgeführt. Hierfür wurden Gefrierschnitte von Gehirnen der beiden Entwicklungsstadien angefertigt. Für die Detektion von *Foxp1* und *Chrna4* wurden Antikörper verwendet, die spezifisch an die Proteine binden. Um die Zellkerne darstellen zu können, wurde die DNA mit Hoechst 33342 angefärbt.

Die Immunfluoreszenz-Färbungen der Gehirnschnitte zeigen, dass *Foxp1* am embryonalen Tag 14 nicht im Thalamus exprimiert wird (Abb. 4.9). Hingegen konnte die Expression von *Chrna4* im Thalamus zu diesem Zeitpunkt bereits detektiert werden. Im Verlauf der nächsten zwei Entwicklungstage beginnt die Expression von *Foxp1* im Thalamus. So sind am embryonalen Tag 16 sowohl *Foxp1*, als auch *Chrna4* im Thalamus exprimiert. Die Expression von *Chrna4* verändert sich von E14 zu E16. Die am Entwicklungstag E14 gezeigte weitflächige Expression von *Chrna4* konzentriert sich am Entwicklungstag E16 auf kleine Regionen des Thalamus. Dies sind Bereiche, wo die Expression von *Foxp1* nicht detektiert wurde. Somit ist die Expression von *Foxp1* und *Chrna4* im Thalamus am Entwicklungstag E16 gegensätzlich.

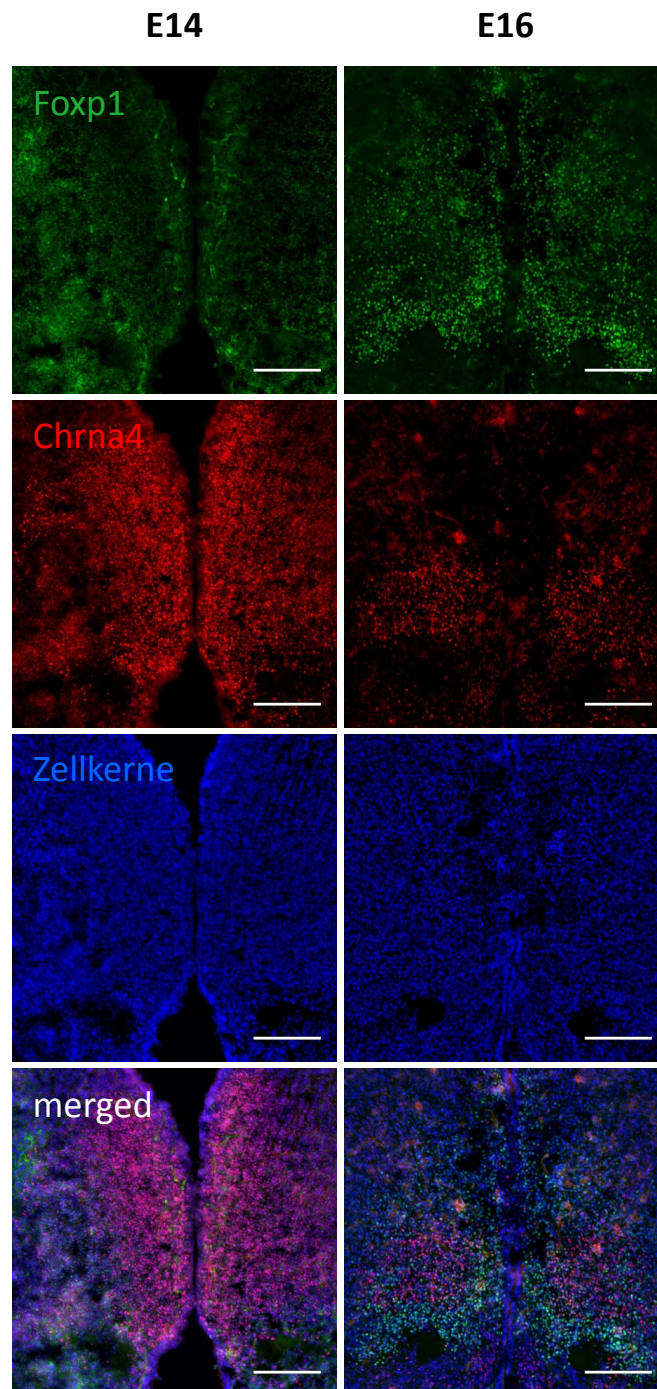


Abbildung 4.9: Expression von Foxp1 und Chrna4 im Thalamus während der embryonalen Gehirnentwicklung.

Immunfluoreszenz-Färbungen auf wt-Gehirnschnitten des Entwicklungsstadiums E14 und E16. An den embryonalen Tagen 14 und 16 ist Chrna4 im Thalamus exprimiert. Foxp1 wird nach ca. 16 Tagen embryonaler Entwicklung exprimiert. Foxp1 und Chrna4 sind zu diesem Entwicklungsstadium in unterschiedlichen Neuronenpopulationen des Thalamus exprimiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 200 μm .

4.2.4 Expression von Foxp1 und Chrna4 im Thalamus von wt und KO Embryonen

Weitere Immunfluoreszenz-Färbungen wurden auf Gefrierschnitten von wt- und KO-Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungstages E16 durchgeführt. Hiermit sollte gezeigt werden, dass die aus den vorangegangenen qPCR-Studien demonstrierte transkriptionelle Repression von *Chrna4* durch Foxp1 im Thalamus auch auf Proteinlevel stattfindet. Verwendet wurden Foxp1- und Chrna-spezifische Antikörper, sowie Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne.

Foxp1 und Chrna4 sind im wt-Thalamus exprimiert. Jedoch ist die Expression der beiden Proteine vorwiegend gegensätzlich (Abb. 4.10). Im Thalamus des KO-Embryos ist Foxp1 nicht exprimiert. Durch eine Genotypisierungs-PCR wurden im Voraus die Genotypen bestimmt. Diese konditionelle *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. Claire Bacon generiert. Es handelt sich hierbei um eine Mauslinie, bei der die Expression von *Foxp1* ausschließlich im Gehirn ausgeschaltet wurde. Die Expression von Chrna4 im Thalamus des KO-Gehirns ist im Vergleich zum wt-Gehirn weitflächiger. Chrna4-Protein wird im KO-Gehirn in Regionen des Thalamus exprimiert, in denen im wt-Gehirn zwar Foxp1, aber nicht Chrna4 exprimiert wurde. Da es sich bei den gezeigten Gefrierschnitten um vergleichbare Ebenen im Gehirn handelt, ist es wahrscheinlich, dass die weitflächigere Expression von Chrna4 im Thalamus des KO-Gehirns auf die fehlende Foxp1 Expression zurückzuführen ist.

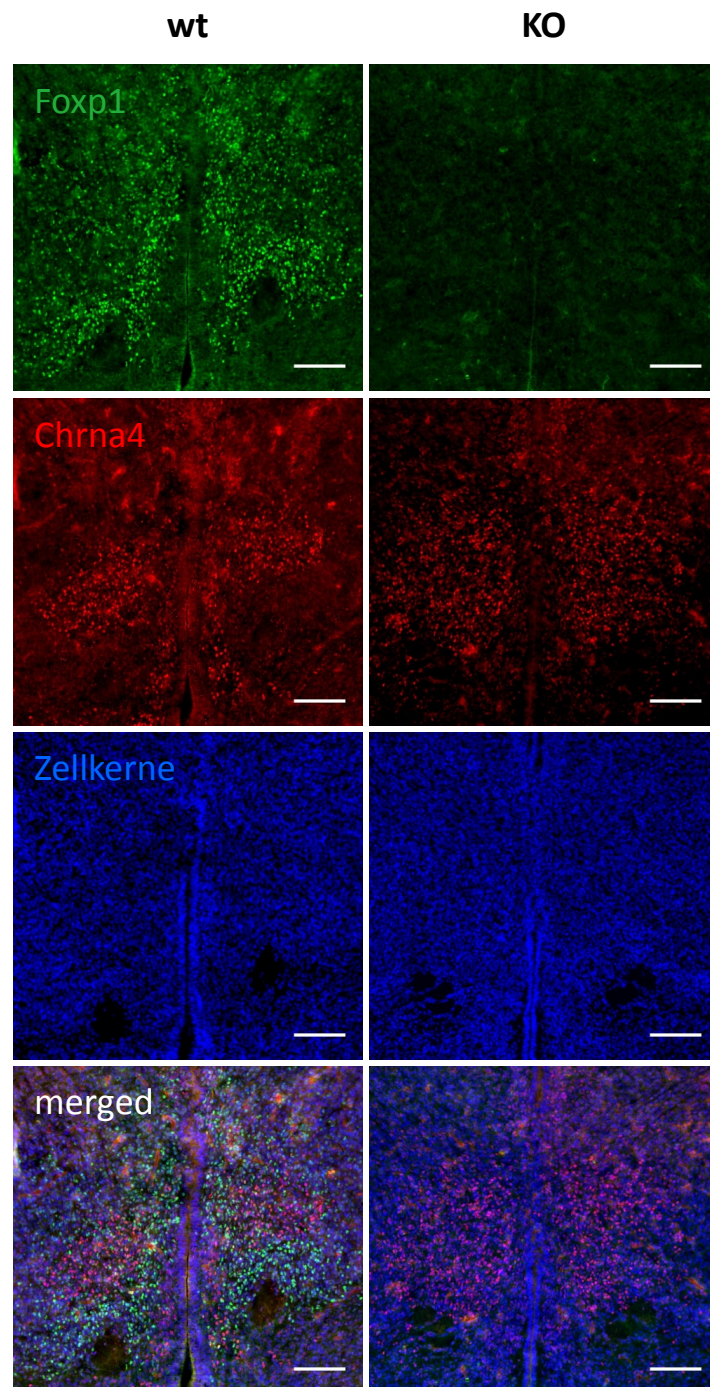


Abbildung 4.10: Expression von Foxp1 und Chrna4 im Thalamus von wt und KO Embryonen. Immunfluoreszenz-Färbungen auf wt- und KO-Gehirnschnitten der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungsstadiums E16. Im Thalamus des wt-Embryos sind Foxp1 und Chrna4 exprimiert. Die Expression von Chrna4 konzentriert sich auf eine Region des Thalamus. Foxp1 hingegen ist vorwiegend außerhalb dieser Region im Thalamus exprimiert. Im Thalamus des KO-Embryos wird Foxp1 nicht exprimiert. Die Expression von Chrna4 im Thalamus des KO-Gehirns ist weitflächiger als im wt-Gehirn. Die Maßstabsbalken entsprechen 200 μm .

4.2.5 Expression von *FOXP1* und *CHRNA4* im adulten humanen Gehirn

Um sicherzustellen, dass *FOXP1* und *CHRNA4* auch im menschlichen Gehirn im Thalamus exprimiert sind, wurden Expressionsstudien durchgeführt. Hierfür wurde RNA vom adulten frontalen Cortex, Hippocampus, Thalamus, Amygdala und Cerebellum verwendet. Die hierfür verwendete RNA wurde von Ambion erworben. Nach Umschreibung der RNA in cDNA wurde die Expression von *FOXP1* und *CHRNA4* mittels semiquantitativer PCR analysiert. Als Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen *ARF1* gemessen. Alle in Abbildung 4.11 dargestellten PCR-Produkte wurden in 35 Zyklen amplifiziert. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass *FOXP1* im adulten frontalen Cortex, Hippocampus, Thalamus und Cerebellum exprimiert wird. *CHRNA4* hingegen wird im Hippocampus, Thalamus und in der Amygdala exprimiert. Somit sind *FOXP1* und *CHRNA4* im Hippocampus und Thalamus koexprimiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die mit Hilfe des Mausmodells gezeigte Regulation von *Chrna4* durch *Foxp1* im Thalamus durch die Koexpression der beiden Proteine auch im menschlichen Gehirn möglich wäre.

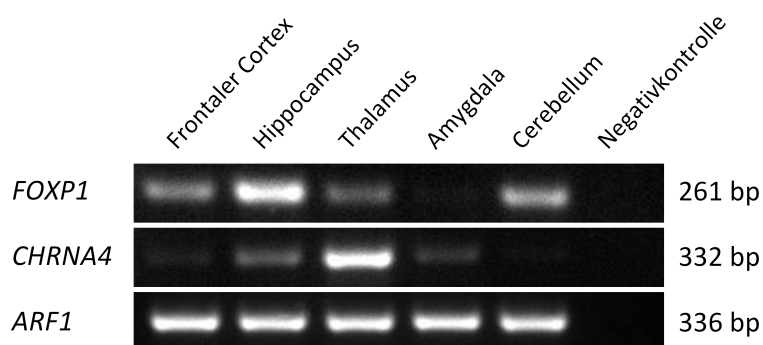


Abbildung 4.11: Expression von *FOXP1* und *CHRNA4* im adulten humanen Gehirn. Semiquantitative PCR zur Analyse der Expression von *FOXP1* und *CHRNA4* im humanen Gehirn (Frontaler Cortex, Hippocampus, Thalamus, Amygdala und Cerebellum). Als Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen *ARF1* gemessen. Es wurden 35 Zyklen angewendet.

4.2.6 Identifizierung von *Foxp1*-Bindungsstellen in der Promotorregion von *Chrna4*

Um die in dieser Arbeit gezeigte Regulation von *Chrna4* durch *Foxp1* weiter zu bestätigen, wurden ChIP-Experimente durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, direkte Interaktionen von Proteinen mit regulatorischen DNA-Sequenzen zu identifizieren. Durch *in silico*-Analysen der 10 kb *upstream*-Promotorregion von *Chrna4* konnten potentielle Bindungsstel-

len von Foxp1 identifiziert werden. Diese Untersuchungen zeigten, dass es in dieser Region zehn Sequenzabschnitte (A-J) gibt, in denen potentielle Bindungsstellen liegen (4.12 A). Zur Aufklärung, welche dieser potentiellen Bindungsstellen von Foxp1 *in vivo* gebunden werden, wurden ChIP-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde das endogene Foxp1-Protein mit einem Anti-Foxp1-Antikörper aus Vorderhirnen von wt-Embryonen des Entwicklungstages E16 immunopräzipitiert und die gebundene DNA mittels qPCR-Methode analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass der Sequenzabschnitt „F“ (mm10, chr2:181043129-181043395) der Promotorregion von *Chrna4* in der Foxp1-ChIP angereichert war (4.12 B+C). Dieser 266 bp lange Sequenzabschnitt liegt ca. 4 kb *upstream* vor dem Transkriptionsstart von *Chrna4* und beinhaltet drei potentielle Bindungsstellen von Foxp1. Zwei dieser Bindungsstellen liegen

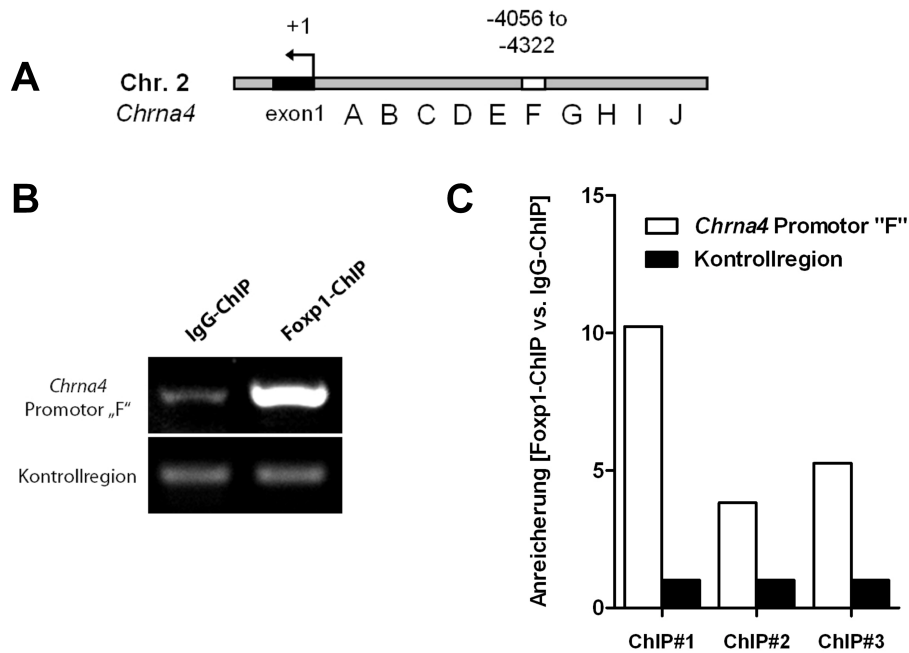


Abbildung 4.12: Identifizierung von Foxp1-Bindungsstellen in der Promotorregion von *Chrna4*. A: Schema der Promotorregion von *Chrna4*. Buchstaben stellen Fragmente unterschiedlicher Längen dar, die potentielle Foxp1-Bindungsstellen enthalten. Diese Fragmente wurden in den Foxp1-ChIP-Ansätzen auf DNA-Anreicherung überprüft. Die weiße Box repräsentiert die Region, welche in der Foxp1-ChIP angereichert war. B: Die semiquantitative PCR der Promotorregion „F“ von *Chrna4* und der Kontrollregion wurde mit DNA von Foxp1- und IgG-ChIP Experimenten durchgeführt. Alle Messungen, die aus der Foxp1-ChIP hervorgingen, wurden auf IgG-ChIP-Messungen normalisiert und mit einer Kontrollregion verglichen (drei unabhängige Experimente). Weiße Balken: Promotorregion „F“ von *Chrna4*; schwarze Balken: Kontrollregion. C: DNA-Anreicherung des Fragmentes „F“ in der Promotorregion von *Chrna4*.

in einem 112 bp-großem Bereich, welche zu 59,8 % zwischen dem murinen (mm10) und dem humanen Genom (hg19) konserviert ist. In drei unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Sequenzabschnitt „F“ in den Foxp1-ChIPs 4- bis 10-fach (weiße Balken) im Vergleich zu der Kontrollregion (schwarze Balken) angereichert ist. Alle Messungen wurden auf Messungen der IgG-ChIP normalisiert. Untersuchungen der anderen neun Fragmente zeigten keine DNA-Anreicherungen in den Foxp1-ChIP Ansätzen. Daher bindet Foxp1 in der untersuchten Promotorregion von *Chrna4* nur an den Sequenzabschnitt „F“.

Diese ChIP-Experimente zeigten eine direkte Interaktion von Foxp1 mit der Promotorregion von *Chrna4* und deuten somit darauf hin, dass die in den vorherigen Ergebnissen gezeigte Regulation direkt ist.

4.2.7 Überprüfung der funktionellen Relevanz der Promotorregion „F“ von *Chrna4*

Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz der Promotorregion „F“ von *Chrna4* wurden Luciferase-Reporter-Assays durchgeführt. Zunächst wurde die Sequenz der Promotorregion „F“ vor das Luciferase-Gen in den pGL3 basic-Vektor kloniert. Zur Normalisierung wurde der pRL-TK-Vektor immer kotransfiziert. Die Luciferase-Reporter-Assays wurden in der Zelllinie N1E-115 durchgeführt. Diese Zelllinie wurde gewählt, da in diesen Zellen in den vorangegangenen Foxp1-Knockdown-Experimenten eine Hochregulation von *Chrna4* in Zellen mit einem verringerten Foxp1-Level beobachtet wurde (4.8 D). Um das Regulationspotential der Promotorregion „F“ von *Chrna4* zu analysieren, wurden die Luciferaseaktivitäten mit und ohne Foxp1-Überexpression gemessen.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Bei den Luciferase-Reporter-Assays wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase des pGL3 basic-Vektors mit und ohne Promotorregion „F“ gemessen. Die weißen Balken repräsentieren Ansätze ohne Foxp1-Überexpression (Kontrolle) und die schwarzen Balken zeigen Ansätze mit einer Foxp1-Überexpression. Die Ergebnisse demonstrieren, dass kein regulatorischer Effekt mit dieser Methode gezeigt werden konnte (zwei unabhängige Experimente). Somit reicht der Sequenzabschnitt „F“ nicht aus, um die Expression der Firefly-Luciferase des pGL3 basic-Vektors zu regulieren. Offensichtlich ist das Zusammenwirken mehrerer regulatorischer Sequenzen und/ oder in diesem Experiment fehlende Kofaktoren notwendig, um die Expression zu beeinflussen.

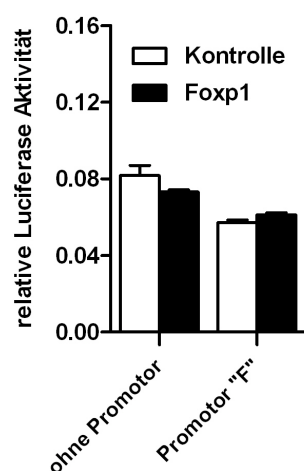


Abbildung 4.13: Luciferase-Assays zur Analyse der funktionellen Relevanz der Promotorregion „F“ von *Chrna4*. Balken repräsentieren die relative Luciferase-Aktivität. Luciferase-Aktivität (pGL3 basic) wurde auf die Renilla-Aktivität (pRL-TK) normalisiert. Weiß: Kontrolle; schwarz: Foxp1. Balken repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehlern.

4.2.8 Biologische Prozesse, an denen *Chrna4* während der embryonalen Gehirnentwicklung beteiligt ist

Um Hinweise auf die Relevanz der identifizierten transkriptionellen Regulation von *Chrna4* durch Foxp1 in molekularbiologischen Vorgängen während der Gehirnentwicklung zu erhalten, wurden die Expressionsdaten der Microarray-Experimente (Mouse Gene 2.0 ST Arrays; Affymetrix) von Dr. Carsten Sticht (Zentrum für Medizinische Forschung, Universitätsklinikum Mannheim) erneut analysiert. Hierbei wurden die Vorderhirn-Expressionsprofile von wt- und KO-Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungsstadium E16 als Grundlage für eine Signalweg-Analyse verwendet. Für die Analyse wurden die Datenbanken Gene Ontology (GO) (Abrahams *et al.*, 2007) und Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa und Goto, 2000), (Kanehisa *et al.*, 2012) verwendet. Um Signalwege herauszufiltern, die in den Gehirnen der KO-Embryonen stark verändert sind, wurden nur diejenigen als relevant angesehen, bei denen die Expression beteiligter Gene mindestens 10 % in den Gehirnen der KO-Embryonen hochreguliert war (FDR < 0,05). Obwohl eine Hochregulation von 10 % nicht stark ist, deuten die FDR-Werte, welche meist deutlich kleiner als 0,05 waren, auf einen wahrscheinlichen veränderten Ablauf in Gehirnen der KO-Embryonen hin. Die Auswertung zeigte, dass 18 biologische Prozesse Veränderungen der Expression der beteiligten Gene aufwiesen. In sieben von diesen 18 Signalwegen, ist *Chrna4* involviert. Hierbei handelt es sich um folgende Signalwege: Zellkommunikation, Kationentransport, Synaptische Transmission, Verhalten, motorisches Verhalten, Transmission von Nervenimpulsen und Metallionen. Diese biologischen Prozesse sind in den Abbildungen 5.6-5.12 (siehe Anhang) als Heatmaps graphisch dargestellt. Die Expression aller Gene, die in den KO-Embryonen differentiell exprimiert wurden, ist farblich dargestellt. Rot bedeutet, dass die Expression erhöht war und grün, dass die Expression der wt-Expression entspricht. Für jedes Gen ist die Expression in allen analysierten Embryo-

nen (KO12, KO122, KO16, wt14, wt15 und wt 118) gezeigt. Des Weiteren sind neben den Gensymbolen und Gennamen auch die GO-Bezeichnungen und -Nummern angegeben. Aus dieser Signalweg-Analyse geht hervor, dass *Chrna4* im entwickelnden Gehirn wahrscheinlich in mehrere biologische Prozesse involviert ist. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wird die Expression von *Chrna4* von *Foxp1* reguliert. Somit wird der Ablauf der Signalwege, in welche *Chrna4* involviert ist, wahrscheinlich beeinflusst. Durch morphologische und elektrophysiologische Studien sowie Verhaltensstudien mit Mäusen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie konnte von Dr. Claire Bacon, in Zusammenarbeit mit Dr. Corentin Le Magueresse (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) und Dr. Miriam Schneider (Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Mannheim), in unserem Labor gezeigt werden, dass die *Foxp1*^{-/-}-Mäuse einen Phänotyp aufweisen. So ist bei den *Foxp1*^{-/-}-Mäusen die Impulsfrequenz der Neuronen im Hippocampus reduziert und sowohl das motorische Verhalten als auch das allgemeine Verhalten ist gestört. Die in dieser Arbeit durchgeführte Signalweg-Analyse zeigte eine veränderte Expression von Genen, einschließlich *Chrna4* bei den biologischen Prozessen „Verhalten“ und „motorisches Verhalten“. Da diese bei Verhaltenstudien bei den KO-Mäusen auffällig waren, ist es möglich, dass durch den fehlenden regulatorischen Einfluss von *Foxp1* auf die beteiligten Gene diese Signalwege gestört sind und zu dem beobachteten Phänotyp führen. Interessant ist auch, dass bei den KO-Mäusen die Impulsfrequenz der Neuronen im Hippocampus reduziert ist. Da die Signalweg-Analyse zeigte, dass die biologischen Prozesse „Kationentransport“, „Zellkommunikation“ und „Synaptische Transmission“ in den Gehirnen der KO-Mäuse verändert sind, könnte die reduzierte Impulsfrequenz der Neuronen auf einen gestörten Ablauf der Signalwege zurückzuführen sein.

5

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden genomweite Methoden angewendet, um Zielgene des Transkriptionsfaktors *Foxp1* *in vivo* zu identifizieren. Obwohl bereits Studien zur Aufklärung der Rolle von *Foxp1* im Gehirn existieren, konnten bisher keine endogenen Zielgene von *Foxp1* während der embryonalen Gehirnentwicklung identifiziert werden (Konstantoulas *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2012). Welche entscheidende Rolle FOXP1 während der Gehirnentwicklung einnimmt, zeigen die Phänotypen von Patienten mit heterozygoten Deletionen bzw. Mutationen im *FOXP1*-Gen. In verschiedenen Studien wurde bisher über insgesamt neun Patienten berichtet, die alle Beeinträchtigungen der Grobmotorik aufweisen und an einer Sprachentwicklungsstörung und geistiger Behinderung (leicht bis mittelschwer) leiden. Bei einigen der Patienten wurde zudem eine Autismusspektrumstörung diagnostiziert (Pariani *et al.*, 2009; Carr *et al.*, 2010; Horn *et al.*, 2010; Hamdan *et al.*, 2010; O’Roak *et al.*, 2011; Palumbo *et al.*, 2013). Um ein besseres Verständnis für die zugrunde liegenden Signalwege zu bekommen, war die Zielsetzung dieser Arbeit, durch *Foxp1* regulierte Gene zu identifizieren und zu charakterisieren. Die durchgeführten *in vivo*- und *in vitro*-Experimente zeigten, dass *Foxp1* die Expression von *Pcdh17* und *Chrna4* während der embryonalen Gehirnentwicklung reguliert und an die Promotoren der beiden Zielgene direkt bindet.

Obwohl bisher keine Zielgene von *Foxp1* im Gehirn bekannt sind, gibt es erste Hinweise aus *in vitro* Studien über Zielgene und molekulare Mechanismen aus *in vitro* Studien. In Experimenten mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurde von Konstantoulas und Kollegen eine Regulation von *Pituitary homeobox 3* (*Pitx3*) durch *Foxp1* aufgedeckt. Diese Regulation ist abhängig von zwei Bindungsstellen im Promotor von *Pitx3*. Durch eine direkte Interaktion mit diesen Bindungsstellen aktiviert *Foxp1* die Expression von *Pitx3* (Konstantoulas *et al.*, 2010). *Pitx3* fördert die Differenzierung von ES-Zellen zu dopaminergen Neuronen. Im Mittelhirn wird *Pitx3* ausschließlich in dopaminergen Neuronen exprimiert und ist hier für die Differenzierung

und/ oder die Aufrechterhaltung dieser Neuronen wichtig (Chung *et al.*, 2006; Smidt *et al.*, 1997; Maxwell *et al.*, 2005). Wie *Pitx3* ist auch *Foxp1* in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert. Da *Foxp1* in den ES-Zellen die Expression von *Pitx3* aktiviert, spekulieren Konstantoulas *et al.*, dass *Foxp1* die Transkription von *Pitx3* in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns reguliert und somit in die Differenzierung und/ oder die Aufrechterhaltung dieser Neuronen *in vivo* involviert ist (Konstantoulas *et al.*, 2010).

Bei einem weiteren Ansatz zur Identifizierung von Zielgenen und Signalwegen, die von *Foxp1* reguliert werden, wurde *Foxp1 in vitro* in murinen striatalen Neuronen überexprimiert und Microarray- und ChIP-Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass eine Vielzahl der regulierten Zielgene in Signalwege des Immunsystems und in Signalwege, die im Zusammenhang mit Chorea Huntington stehen, involviert sind. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde *Foxp1 in vivo* über Lentiviren im Striatum überexprimiert. Diese Versuche zeigten, dass die in *in vitro* beobachtete Regulationen der Zielgene signifikant mit Gliazellen assoziiert sind (Tang *et al.*, 2012). Die Daten dieser Studie sind kritisch zu beurteilen, da die aus dem Microarray-Screening gewonnenen Zielgene nicht durch die durchgeführten ChIP-Experimente bestätigt werden konnten. Des Weiteren ist ein funktioneller Bezug der Daten nicht gegeben, da *Foxp1* nicht endogen in Gliazellen des Striatums exprimiert ist.

5.1 Etablierung der ChIP-Methode mit endogenen Proteinen

Die ChIP-Methode ermöglicht es, durch das Crosslinken der DNA mit den Proteinen und einer anschließenden Immunpräzipitation genomweite Bindungsstellen eines Transkriptionsfaktors *in vivo* zu identifizieren. Bei dieser sensitiven Methode ist die Wahl des Antikörpers ein kritischer Punkt. Denn das Ergebnis einer ChIP wird stark durch die Qualität des Antikörpers bestimmt. Ein spezifischer Antikörper reichert Bindungsstellen im Vergleich zu unspezifischen gebundenen Sequenzen (Hintergrund) stark an und macht es somit leichter, Bindungsstellen zu detektieren (Park, 2009; Furey, 2012). Für die Etablierung dieser Methode habe ich Chromatin aus Vorderhirnen von Wildtyp-Mausembryonen des embryonalen Entwicklungsstadium E16 verwendet, da dieses Stadium bereits für die qPCR-Experimente verwendet wurde. Zudem ist *Foxp1* zu diesem Zeitpunkt erstmals stark im Cortex, Striatum, Thalamus und Hippocampus exprimiert. Wie bereits diskutiert, sind bis heute keine Zielgene von *Foxp1* im Gehirn bekannt. Somit war es nach Abschluss einer *Foxp1*-ChIP nicht möglich, den Erfolg der ChIP anhand bekannter Zielgene zu überprüfen. Um jedoch die ChIP-Methode zu etablieren und zu validieren, wurde daher zunächst ein Polymerase II-Antikörper (Pol II) eingesetzt. Dieser Antikörper wurde bereits in anderen Laboren für die Etablierung der ChIP-Methode verwendet (Axel Visel, persönliche Mitteilung). Als Kontrollen wurden bei jedem ChIP-Protokoll

ein Input- und ein IgG-Ansatz durchgeführt. Durch den Vergleich der ChIP-Ergebnisse mit dem Input-Kontrollansatz können Einflüsse wie die Zugänglichkeit des Chromatins verschiedener Bereiche und verschieden lange Fragmentgrößen korrigiert werden. Als Negativkontrolle wurde eine Mock-Immunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurde IgG als Isotyp-Kontroll-Antikörper verwendet, um unspezifische Bindungen des Ziel-Antikörpers aufzudecken. Diese können durch die Bindungen des Fc-Fragmentes des IgGs an zelluläre Fc-Rezeptoren oder andere Protein-Protein-Interaktionen entstehen. Die Überprüfung des Erfolges einer durchgeführten ChIP erfolgte mittels qPCR-Analysen. Wie bekannt ist, bindet die Polymerase II an TATA-Box-Sequenzen von eukaryotischen Genen. Fragment-Anreicherungen der TATA-Box-Sequenzen der Housekeeping-Gene *β-actin* und *Gapdh* zeugten daher von einer erfolgreichen ChIP (Abbildung 4.5). Um sicher zu gehen, dass diese Anreicherungen nicht durch Artefakte verursacht waren, wurden auch 1 kb *upstream* gelegene Sequenzen überprüft. Jede Messung wurde mit Messungen der IgG-Kontrolle verglichen. Da in den für diese Arbeit durchgeführten ChIP-Experimenten nur die TATA-Box-Sequenzen von *β-actin* und *Gapdh* angereichert waren, wurde das ChIP-Protokoll erfolgreich etabliert. Auch die Anwendung des kommerziell verfügbaren Foxp1-Antikörpers (Abcam ab16645) führte zu einer spezifischen Anreicherung. Dies konnte anhand der in dieser Arbeit identifizierten Zielgene von Foxp1 gezeigt werden (Abbildungen 4.6, 4.12). Obwohl ich die ChIP-Methode mit endogen exprimiertem Foxp1 von Vorderhirnen von Embryonen des Entwicklungstages E16 etablieren konnte, war das Ergebnis nicht für „Next generation sequencing“ geeignet. Denn für die Sequenzierung werden DNA-Fragmente einer Größe von 150 bis 300 bp benötigt (Park, 2009). Trotz zahlreicher Versuche diese Fragmentgrößen zu erreichen, konnte ich mit keinem der verwendeten Sonifizierer (Cell disruptor Model W185F, Covaris S220, Diagenode Bioruptor) die hierfür optimalen Bedingungen herausfinden. Das beste Ergebnis wurde mit dem Cell disruptor Model W185F-Sonifizierer erreicht. Die sonifizierten DNA-Fragmente hatten eine Größe von 100 bis 10.000 bp, wobei die meisten Fragmente zwischen 200 und 1000 bp groß waren. Daher wurde die Identifizierung von Bindungsstellen in Promotoren potentieller Zielgene von Foxp1 mittels qPCR-Analysen durchgeführt.

5.2 Zielgen-Screening: *FOXP1*-Knockdown-Studien in SH-SY5Y Zellen

In einem ersten Ansatz zur Identifizierung von Zielgenen von FOXP1 wurde die Expression von *FOXP1* über *FOXP1*-spezifische siRNAs in Neuroblastoma-Zellen reduziert und die Expression dieser Zellen mittels Microarrays mit Zellen, die mit Kontroll-siRNAs transfiziert waren, verglichen. Die Knockdown-Studien wurden in den humanen SH-SY5Y-Zellen durchgeführt. Diese Zellen wurden für das Zielgen-Screening ausgewählt, da diese bereits für

die Identifizierung von Zielgenen des stark homologen Transkriptionsfaktors FOXP2 verwendet wurden (Vernes *et al.*, 2008). Ein weiterer Grund war, dass die konditionelle *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie, welche in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Claire Bacon generiert wurde, zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand.

RNA Interferenz (RNAi) ist ein posttranskriptioneller Mechanismus, welcher zur Regulation der Expression von Genen beiträgt. In eukaryotischen Zellen wird so die Expression über endogen kodierte MicroRNAs (miRNAs) supprimiert. Dieser Mechanismus wird auch genutzt, um die Expression bestimmter Gene artifiziell über synthetische synthetisierte siRNAs herunterzuregulieren (Fire *et al.*, 1998; Hutvágner und Zamore, 2002; Sharp, 2001; Waterhouse *et al.*, 2001). Knockdown-Experimente mit siRNAs sind zwar eine elegante Methode, die endogene Expression eines Gens zu reprimieren, jedoch ist es bekannt, dass die 21-23 Nukleotide langen siRNAs zu unspezifischen Effekten führen. Diese werden als „Off-Target-Effekte“ bezeichnet, welche meistens durch Kompatibilität der Nukleotide zwei bis sieben der siRNAs („Seed-Region“) mit anderen genomischen Sequenzen hervorgerufen werden (Lin *et al.*, 2005; Birmingham *et al.*, 2006). Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte nicht auf „Off-Target-Effekte“ zurückzuführen sind, wurden in dieser Arbeit „Silencer Select“ siRNAs (Invitrogen) verwendet, bei denen durch Modifikationen der Seed-Region unspezifische Bindungen reduziert wurden. Des Weiteren wurde bei jedem Experiment darauf geachtet, dass mindestens zwei *Foxp1*-spezifische siRNAs eingesetzt wurden. Für eine genomweite Analyse wurden zwei unabhängige Knockdown-Experimente durchgeführt, die RNA der Knockdown- und Kontrollansätze miteinander vereinigt und anschließend die Expression auf Microarrays verglichen. Besonders interessante potentielle Zielgene wurden in weiteren SH-SY5Y-Knockdown-Studien untersucht. Da zu diesem Zeitpunkt bereits die konditionelle *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie generiert wurde, wurde die murine Neuroblastoma-Zelllinie N1E-115 für weitere Knockdown-Studien gewählt. Die Ergebnisse zeigten, dass drei der untersuchten potentiellen Zielgene in beiden Zelllinien reguliert sind. Daher wurden diese drei Gene, *Pcdh17*, *Tspan8* und *Glt8d2* für Untersuchungen mit Material der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie ausgewählt. Hierfür wurde RNA aus den Vorderhirnen von den Entwicklungstagen E13, E15 und E16 von wt und KO-Embryonen isoliert und qPCR-Experimente durchgeführt. Die Daten dieser Validierung zeigten, dass weder *Tspan8*, noch *Glt8d2* in den Vorderhirnen reguliert sind. Jedoch konnten diese *in vivo*-Experimente die in den *in vitro*-Experimenten beobachtete Regulation von *Pcdh17* bestätigen. *Pcdh17* ein Kalzium-abhängiges Zelladhäsionsprotein und ist für die Bildung von Adhäsionsverbindungen wichtig (Abb. 5.1). Es gehört zu der Familie der Protocadherine, welche eine Untergruppe der Cadherine darstellen und bei Vertebraten vorwiegend im Nervensystem exprimiert werden. Heutzutage sind beim Menschen mehr als 100 Cadherine bekannt, die sich durch typische „Cadherin-Repeats“ in der extrazellulären Domäne auszeichnen (Takeichi, 1988; Yagi und Takeichi, 2000; Nollet *et al.*, 2000). Die Protocadherine sind mit mehr als 70

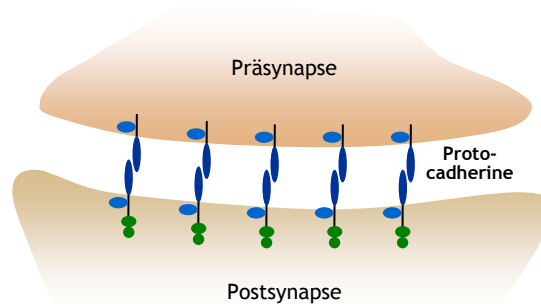


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Zelladhäsionsproteins Pcdh17 an der Synapse. Pcdh17-Proteine (dunkelblau) binden Kalzium und verbinden somit Prä- und Postsynapse.

verschiedenen Mitgliedern die größte Cadherin-Unterfamilie (Redies *et al.*, 2005). Die Protocadherin-Unterfamilie kann wiederum in zwei Untergruppen eingeteilt werden, den „Clustered“- und den „Nonclustered“-Protocadherinen (Redies *et al.*, 2005). Pcdh17 ist ein „Nonclustered“-Protocadherin, und für diese Untergruppe konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass diese Protocadherine nicht nur während der Gehirnentwicklung, sondern auch im adulten Gehirn exprimiert werden (Hirano *et al.*, 1999; Yamagata *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007; Redies *et al.*, 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass Beeinträchtigungen der Expression und Funktionalität von Protocadherinen zu neuropsychiatrischen Krankheiten wie Autismusspektrumstörung, geistiger Behinderung und Schizophrenie führen können (Bray *et al.*, 2002; Dean *et al.*, 2007; Dibbens *et al.*, 2008; Morrow *et al.*, 2008; Gregório *et al.*, 2009). Die Daten weiterer Studien belegen, dass Protocadherine eine wichtige Rolle bei der Neuralrohr-Regionalisierung, der Differenzierung des Cortex, der Entstehung von neuronalen Kreisläufen und dendritischen Dornfortsätzen sowie der Entstehung und Remodellierung von Synapsen spielen (Hirano *et al.*, 2003; Redies, 2000; Takeichi, 2007; Hirano und Takeichi, 2012). Bei Patienten mit geistiger Behinderung wurden bereits Deletionen und Mutationen in Genen gefunden, welche für synaptische Proteine kodieren. Durch Tiermodell-Studien konnte gezeigt werden, dass diese Mutationen die Struktur und/ oder die Funktion der Synapsen beeinträchtigt (Guilmatre *et al.*, 2009; Hamdan *et al.*, 2009, 2011; Südhof, 2008). Molekulare Mechanismen, die bei Patienten mit geistiger Behinderung gestört sind, können prä- und postsynaptische Signalwege, Umstrukturierungen des Cytoskeletts, intrazelluläre Signalübertragungen, die Regulation der Transkription und epigenetische Modifizierungen des Chromatins betreffen (Abb. 5.2) (van Bokhoven, 2011). Wie mehrere aktuelle Studien zeigen, führt eine Haploinsuffizienz von *FOXP1* zu geistiger Behinderung (Pariani *et al.*, 2009; Carr *et al.*, 2010; Horn *et al.*, 2010; Hamdan *et al.*, 2010; Palumbo *et al.*, 2013). Diese Fälle lassen ver-

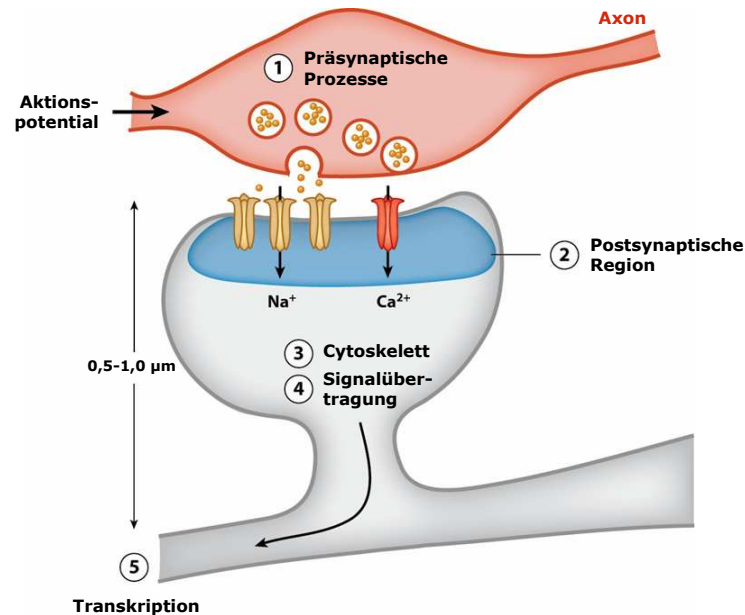


Abbildung 5.2: Neuronale Prozesse, welche bei Patienten mit geistiger Behinderung gestört sein können.

Struktur einer typischen chemischen Synapse, bei der das Axon des präsynaptischen Neurons mit dem Dendriten des empfangenden postsynaptischen Neurons verbunden ist. ①: Eine Stimulierung des Nervs führt zu einem Aktionspotential, hierdurch fusionieren Vesikel mit der Membran und Neurotransmitter werden in den synaptischen Spalt freigegeben. Diese binden an Rezeptoren der Postsynapse, wodurch Ionenkanäle geöffnet werden. Es entsteht ein postsynaptisches Potential. ②: Die Aktivierung von Rezeptoren initiiert eine Reihe von Signalvorgängen in der postsynaptischen Region. ③: Im Falle der Bildung von Langzeiterinnerungen kommt es zu einer Reorganisation des Cytoskeletts, ④: sowie der Aktivierung von zellulären Signalwegen. ⑤: Diese Vorgänge haben einen sofortigen Einfluss auf die neuronale Genexpression. Alle diese Abläufe können durch Gendefekte zerstört werden und zu geistiger Behinderung führen. Modifiziert nach van Bokhoven (2011).

muten, dass durch die heterozygoten *FOXP1*-Deletionen und -Mutationen die Regulation der Transkription von Zielgenen in den Synapsen gestört ist. Die Daten dieser Arbeit bestätigen diese Annahme. Es konnte gezeigt werden, dass in embryonalen Gehirnen von KO-Embryonen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie die Transkription des *Pcdh17*-Gens, welches für ein Zell-Adhäsionsprotein kodiert, im Vergleich zu wt-Embryonen niedriger ist. Daher aktiviert Foxp1 die Transkription von *Pcdh17* in den Neuronen. Die hier gezeigte herunterregulierte Expression, führt wahrscheinlich in den Gehirnen der KO-Tiere und der Patienten zu einer geringeren Anzahl an Zell-Zell-Verbindungen zwischen Prä- und Postsynapsen. Der verringerte Einbau der Proteinkomplexe beeinflusst daher die Bildung und Stabilität synaptischer Kontakte. Dass eine beeinträchtigte Expression von Protocadherinen zur Ausprägung einer geistigen Behinderung führen kann, zeigen Mutationen in *Pcdh19* (Hynes *et al.*, 2010; Dibbens *et al.*, 2008; Jamal *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2012). *Pcdh19* gehört wie auch *Pcdh17* zu den

„Nonclustered“-Protocadherinen. Da beide Proteine strukturell ähnlich sind, ist es möglich, dass eine fehlerhafte Regulation von *Pcdh17* einen ähnlichen kognitiven Phänotyp hervorruft. Die Expressionsdaten dieser Arbeit zeigen, dass sowohl im murinen als auch im menschlichen Gehirn *Pcdh17* im Hippocampus, Thalamus und Cortex exprimiert ist. Eine starke Expression von *Pcdh17* wurde auch im murinen Striatum beobachtet. Zudem konnte in einer Studie gezeigt werden, dass *PCDH17* auch beim Menschen im Striatum exprimiert ist (Abrahams *et al.*, 2007). In allen diesen Gehirnarealen konnte in dieser Arbeit anhand der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie demonstriert werden, dass Foxp1 die Transkription am Entwicklungstag E16 aktiviert. Weiterhin zeigten die Daten, dass die Regulation im Vorderhirn bereits an Tag E13, mit beginnender Expression von Foxp1, einsetzt. Nicht nur das ähnliche Expressionsmuster von *Pcdh17* in murinen und humanen Gehirn lässt vermuten, dass diese Regulation auch im menschlichen Gehirn eine wichtige Rolle spielt, auch die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente in den humanen SH-SY5Y Neuroblastomazellen demonstrieren einen Einfluss von FOXP1 auf die Expression von *PCDH17*. Ein weiterer Hinweis auf die Relevanz dieser Regulation im menschlichen Gehirn gibt die im Rahmen dieser Arbeit mittels der ChIP-Methode aufgedeckte 629 bp-langen genomischen Abschnitt der Promoterregion von *Pcdh17*, in der Foxp1 bindet. Dieser Abschnitt enthält acht *in silico* vorhergesagte Foxp1-Bindungsstellen und ist zwischen Maus (mm10) und Mensch (hg19) 77,6 % konserviert. Zur Bestimmung des funktionellen Einflusses dieses Abschnittes wurden in dieser Arbeit Luciferase-Reporter-Gen-Assays durchgeführt. Die Experimente zeigten, dass diese 629 bp-lange Sequenz nicht ausreicht, um die Expression der Firefly-Luciferase zu aktivieren. Dies bedeutet jedoch nicht, dass diese Sequenz *in vivo* keine Rolle spielt. Gründe für das Ergebnis des Luciferase-Reporter-Gen-Assays können fehlende Kofaktoren in den verwendeten N1E-115 Zellen oder fehlende Interaktionen mit Proteinen anderer regulatorischer Sequenzen sein. Es ist bekannt, dass viele der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren weit vom proximalen Promotor entfernt liegen können (Chen *et al.*, 2008). Diese regulatorischen Sequenzen werden bei einem Luciferase-Reporter-Gen-Assay vernachlässigt. Daher spiegelt dieser Assay nicht den *in vivo*-Einfluss einer Promotorregion auf die Expression eines Gens wider. Die ChIP-Experimente zeigen jedoch deutlich, dass Foxp1 den Promotor von *Pcdh17* direkt bindet. Da Foxp1 im Mausmodell und in den murinen und humanen Zelllinien die Expression von *Pcdh17* reguliert, lassen diese Daten vermuten, dass die *FOXP1*-Haploinsuffizienz zu einer Misregulation von *PCDH17* führt und diese wahrscheinlich einen Einfluss auf die Kognition der Patienten hat.

Interessant in Hinblick auf die Sprachentwicklungsstörungen der Patienten mit heterozygoten *FOXP1*-Mutationen ist eine Publikation von Abrahams und Kollegen. Bei genomweiten Untersuchungen humaner Gehirne konnte gezeigt werden, dass sowohl *PCDH17* als auch *CNTNAP2* in embryonalen Cortices stark in den frontalen und anterioren Regionen exprimiert sind. Die Ergebnisse durchgeführter RNA *in situ* Hybridisierungen zeigten zudem eine überlappende Expression beider Gene im Striatum und Thalamus (Abrahams *et al.*, 2007). Alle diese Gehirnareale sind in Kreisläufe verwickelt, die für diverse kognitive Prozesse, wie beispielsweise die

Sprachentwicklung, essentiell sind (Lieberman, 2002; Diamond, 2000). In weiteren Studien wurde bereits eine Rolle von *CNTNAP2* bei der Sprachentwicklung gezeigt. Bis heute sind nicht viele Gene bekannt, dessen Proteine für den Erwerb von Sprache wichtig sind. Aufmerksam auf *CNTNAP2* wurde man durch den Transkriptionsfaktor *FOXP2*, der auch bei der Sprachentwicklung eine wichtige Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, dass *FOXP2* die Expression von *CNTNAP2* herunterreguliert. Ein direkter Zusammenhang zwischen *CNTNAP2* und Sprachentwicklungsstörungen wurde anhand von Assoziationsstudien aufgedeckt. Hierbei konnte ein SNP signifikant mit einer spezifischen Sprachentwicklungsstörung (SLI) assoziiert werden (Vernes *et al.*, 2008). Da *PCDH17* ein mit *CNTNAP2* überlappendes Expressionsmuster im embryonalen humanen Gehirn hat und die Patienten mit Mutationen im *FOXP1*-Gen auch eine Sprachentwicklungsstörung zeigen, könnte die in dieser Arbeit gezeigte reduzierte Expression von *Pcdh17* in Gehirnen der KO-Embryonen in Hinblick auf die Sprachenwicklung eine Rolle spielen. Im Zusammenhang mit dem Einfluss von *PCDH17* auf die Kognition ist aus einer früheren Studie bekannt, dass *PCDH17* im Brodmann-Areal 46 bei Patienten mit Schizophrenie angereichert ist. Daher ließen diese Daten vermuten, dass das Expressionslevel von *PCDH17* im frontalen Cortex eine Ursache der Erkrankung sei (Dean *et al.*, 2007). Schizophrenie wurde bisher bei keinem der Patienten mit Mutationen im *FOXP1*-Gen diagnostiziert. Dies könnte daran liegen, dass die Patienten noch im Kinderalter sind und Schizophrenie sich oft erst im Erwachsenenalter manifestiert. Da davon auszugehen ist, dass sowohl bei Patienten mit Schizophrenie, als auch bei „*FOXP1*-Patienten“ nicht nur die Missregulation von *PCDH17* für die kognitiven Phänotypen verantwortlich ist, ist wahrscheinlich die Kombination der fehlerhaft regulierten Gene entscheidend.

5.3 Zielgen-Screening: Vorderhirne der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungstages E16

Um weitere Zielgene des Transkriptionsfaktors *Foxp1* aufzudecken, wurde erneut ein genomweites Zielgen-Screening durchgeführt. Bei diesem Screening wurde RNA aus Vorderhirnen von Embryonen der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungstages E16 verwendet. Dieses Stadium wurde ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt *Foxp1* nicht nur im Striatum und Cortex, wie am Entwicklungstag E13, sondern auch im Thalamus und Hippocampus exprimiert ist. Zudem ist *Foxp1* an diesem Entwicklungstag stark im Striatum und Cortex exprimiert. Für das Zielgen-Screening wurden drei KO- und drei wt-Embryonen aus zwei Würfen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie verwendet. Um die technische Variation so niedrig wie möglich zu halten, wurden Microarrays aus einer Charge verwendet. Zudem wurde die Präparation der Gehirne und die Extraktion der RNA aus den Vorderhirnen parallel und zu exakt gleichen Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich zu den zwei Würfen, die für die Microarrays verwendet

wurden, wurden für die Validierung zwei weitere Würfe der konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie des Entwicklungstages E16 eingesetzt. Die Erhöhung der Wurfzahl wurde vorgenommen, um durch eine höhere Anzahl biologischer Replikate Regulationen herauszufiltern, die lediglich durch eine biologische Variation zustande kamen. Wie groß die biologische Variation zwischen den Würfeln war, zeigten die Ergebnisse der qPCR-Validierung. Bei den insgesamt 20 KO vs. wt-Vergleichen, die für jedes der 23 potentiellen Zielgene durchgeführt wurden, konnte nur bei einem Gen eine konstante Regulation bestätigt werden. Hierbei handelt es sich um das Gen *Neuronaler Acetylcholinrezeptor, Untereinheit alpha-4* (*Chrna4*). Es kodiert für die $\alpha 4$ -Untereinheit von pentameren Acetylcholinrezeptoren im Nervensystem (Abb. 5.3). Diese

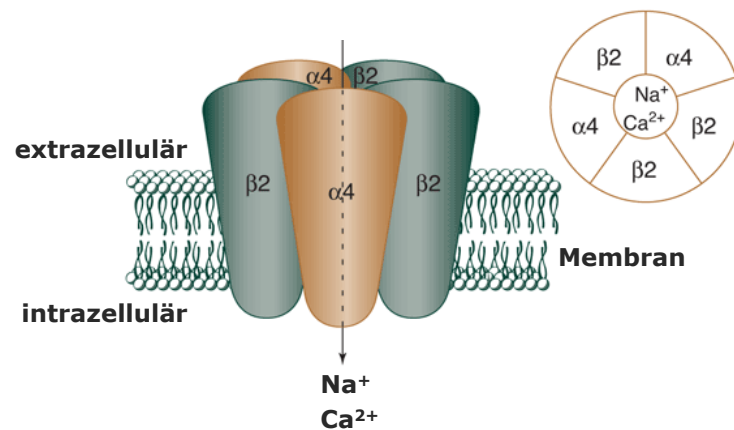


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung eines $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptors. Pentamere $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptoren bestehen aus zwei $\alpha 4$ - und drei $\beta 2$ -Untereinheiten. Dies ist der vorherrschende Acetylcholinrezeptor-Subtyp im Gehirn. Der in der Mitte der fünf Untereinheiten liegende Kanal ist für Natrium (Na^+) und Kalzium (Ca^{2+}) durchlässig. Modifiziert nach Davis und de Fiebre (2006).

Neurotransmitterrezeptoren gehören zu der Klasse der ligandengesteuerten Transmembran-Ionenkanälen. Der vorherrschende Acetylcholinrezeptor-Subtyp im Gehirn besteht aus $\alpha 4$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten (Whiting und Lindstrom, 1987; Flores *et al.*, 1992). Für $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptoren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass diese eine wichtige Rolle bei kognitiven Vorgängen wie der Wahrnehmung, Emotionen und der Sprachverarbeitung spielen (Picciotto *et al.*, 1995; Barrantes, 1998; Markett *et al.*, 2011). Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass *Foxp1* die Expression von *Chrna4* während der embryonalen Gehirnentwicklung reprimiert. Diese Repression der Expression wird vermutlich über den bei den Foxp-Proteinen bekannten Mechanismus der transkriptionellen Repression durch die Rekrutierung von Histon-Deactylasen hervorgerufen (Chokas *et al.*, 2010). Da dieser Mechanismus eine direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an die Promotorregion des Zielgens voraus-

setzt, wird die Vermutung durch die in dieser Arbeit gezeigte direkte Bindung Foxp1 4 kb *upstream* vor dem Transkriptionsstart von *Chrna4* gestützt. Diese Bindungsstelle liegt zudem im proximalen Promotor von *Pcdh17*. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Fox-Bindungsstellen gleichmäßig in der 10 kb *upstream* Promotorregion und in den ersten Exons verteilt sind. Hingegen beinhalten Sequenzen nahe des Transkriptionsstarts meist keine Bindungsstellen (Wederell *et al.*, 2008; Kranz *et al.*, 2011). Zur Überprüfung eines funktionellen Einflusses der in dieser Arbeit identifizierten direkten Bindung von Foxp1 4 kb *upstream* vor dem Transkriptionsstart von *Chrna4*, wurden Luciferase-Reportergen-Assays durchgeführt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von Foxp1 an diese Region nicht zu einer Aktivierung führt. Da die Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass Foxp1 die Expression von *Chrna4* reprimiert, wäre auch keine Aktivierung zu erwarten gewesen. Eine Repression der Firefly-Luciferase wurde jedoch auch nicht beobachtet. Dies bedeutet allerdings nicht, dass die identifizierte Promotorregion von *Chrna4*, die von Foxp1 *in vivo* gebunden wurde, keine funktionelle Relevanz hat. Es ist schwierig einen reprimierenden Einfluss einer Sequenz im Luciferase-Reportergen-Assay nachzuweisen, da das Grundlevel der Firefly-Luciferase so niedrig ist, dass eine Repression kaum messbar ist. Wie bereits diskutiert, stellt dieser Assay ein artifizielles System dar, in dem mögliche benötigte Kofaktoren oder andere regulatorische Sequenzen fehlen.

Anhand der verwendeten konditionellen *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie konnte in qPCR-Studien demonstriert werden, dass die Regulation von *Chrna4* am Entwicklungstag E15 mit einsetzender Expression von Foxp1 im Thalamus beginnt. Die durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten, dass eine frühere Regulation über Foxp1 nicht möglich ist, da am Entwicklungstag E14 Foxp1 nicht im Thalamus exprimiert ist. Zu diesem Zeitpunkt der Gehirnentwicklung ist *Chrna4* bereits weitflächig im Thalamus exprimiert. Diese Expression verändert sich bis E16. Dies ist wahrscheinlich auf die einsetzende Expression von Foxp1 zurückzuführen. So ist die vorher weitflächige Expression von *Chrna4* am Entwicklungstag E16 nur noch auf eine Region des Thalamus konzentriert, in der Foxp1 kaum exprimiert ist. Die Immunfluoreszenz-Färbungen von Foxp1 und *Chrna4* auf wt- und KO-Gehirnen von Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie erhärten die Hypothese, dass die Expression von *Chrna4* durch die Repression von *Chrna4* durch Foxp1 am Entwicklungstag E16 verändert ist. Denn auf den KO-Gehirnschnitten ist die Expression von *Chrna4* nicht wie beim wt-Gehirn auf eine Region konzentriert, sondern auch in vielen der umliegenden Neuronen exprimiert. Hierbei handelt es sich um Neuronen, die in wt-Embryonen Foxp1 exprimieren. Durch die fehlende Foxp1-Expression in den KO-Gehirnen findet somit hier keine Repression von *Chrna4* mehr statt. Die ausbleibende Regulation führt nun wahrscheinlich dazu, dass *Chrna4* in diesen Neuronen exprimiert wird. Diese Ergebnisse sind besonders interessant in Bezug auf die Sprachstörung, die bei Patienten mit heterozygoten *FOXP1*-Mutationen auftritt. Obwohl lange angenommen wurde, dass die Broca- und Wernicke-Areale des Cortex die Sprachzentren unseres Gehirns sind, ist mittlerweile bekannt, dass der Cortex, die Basalganglien und der Thalamus ein Netzwerk bilden, welches

für den Erwerb, die Aufnahme und die Wiedergabe von Sprache verantwortlich ist. Der Thalamus spielt hierbei eine zentrale Rolle. So bekommt diese neuroanatomische Struktur Input von den Basalganglien, welche wiederum an verschiedene cortikale Regionen weitergeleitet werden. Anatomisch abgetrennte Neuronenpopulationen können in diesem Kreislauf miteinander kommunizieren und somit verschiedene Aspekte der Sprache regulieren (Lieberman, 2002; Diamond, 2000). Da im Thalamus der KO-Embryonen spezifische Neuronenpopulationen *Chrna4* exprimieren, die in den wt-Embryonen *Chrna4*-negativ sind, ist anzunehmen, dass diese veränderte Expression durch die fehlende Repression durch *Foxp1* zu Stande kommt und somit den Ablauf neuronaler Kreisläufe verändert. Dies könnte auch in den Gehirnen der „*FOXP1*-Patienten“ möglich sein. Wäre dies der Fall, dann könnte die veränderte Expression von *CHRNA4* im Thalamus mit für die Sprachentwicklungsstörungen der Patienten verantwortlich sein. Einen Hinweis darauf, dass dies tatsächlich möglich ist, zeigt eine Studie von Markett und Kollegen. In dieser Studie konnte demonstriert werden, dass *CHRNA4* einen Einfluss auf das phonologische Arbeitsgedächtnis hat (Markett *et al.*, 2011). Die Ergebnisse stammen aus Untersuchungen der Basalganglien. Bei der Studie wurde ein möglicher Einfluss im Thalamus nicht untersucht. Da in dieser Arbeit die Expression von *Chrna4* im adulten Gehirn nicht untersucht wurden, ist es nicht ausgeschlossen, dass *Chrna4* postnatal auch in den Basalganglien exprimiert wird. In diesem Fall wäre es möglich, dass die in dieser Arbeit identifizierte Regulation von *Chrna4* im embryonalen Gehirn zwar nur im Thalamus abläuft, aber im adulten Gehirn auch in den Basalganglien stattfindet. Bis heute sind noch keine Patienten mit einer Sprachstörung bekannt, bei denen eine *CHRNA4*-Mutation ursächlich für die Krankheit ist.

In Hinblick auf die geistige Behinderung der „*FOXP1*-Patienten“ ist der Drei-Generationen-Stammbaum einer koreanischen Familie interessant. In dieser Familie tragen neun der 19 Mitglieder eine „missense“-Mutation in Exon 5 des *CHRNA4*-Gens. Diese Punktmutation wird autosomal-dominant vererbt und führt zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Leucin in der zweiten Transmembrandomäne (Ser252Leu). Alle Träger dieser Mutation leiden an nächtlicher Frontalhirnepilepsie und geistiger Behinderung (leicht bis mittelschwer) (Cho *et al.*, 2003). Da es für diese Mutation keine transgene Mauslinie gibt, konnte bisher nicht direkt gezeigt werden, dass diese Mutation einen Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors hat. Jedoch existiert eine transgene Mauslinie bei der eine Punktmutation in *Chrna4* zum Austausch der Aminosäure 252 von Serin zu Phenylalanin führt. Beide ausgetauschten Aminosäuren, Leucin und Phenylalanin, sind unpolar. Daher ist es wahrscheinlich, dass der Austausch beider Aminosäuren ähnliche funktionelle Auswirkungen haben wird. In einer Studie über die *Chrna4*^{S252F}-transgene Mauslinie konnte gezeigt werden, dass die transgenen Mäuse im Vergleich zu den wt-Mäusen eine erhöhte cortikale EEG-Aktivität aufweisen (Klaassen *et al.*, 2006). So könnte bei Patienten mit Ser252Leu-Mutationen die Aktivität des Acetylcholinrezeptors erhöht sein. Dies wäre eine plausible Erklärung für den bei den Patienten auftretenden kognitiven Phänotyp. Interessant ist diese Hypothese auch in Hinblick auf die in dieser Ar-

beit zeigte Regulation. Die Ergebnisse zeigen, dass in den Gehirnen der KO-Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie die Expression von *Chrna4* erhöht ist. Wenn diese Regulation auch im menschlichen Gehirn stattfindet, dann könnte die vermehrte Expression von *CHRNA4* zu einer erhöhten Anzahl von Acetylcholinrezeptoren führen, wodurch die Gesamtaktivität aller Acetylcholinrezeptoren möglicherweise erhöht ist. Wäre dies der Fall, dann wäre wie auch bei den Patienten mit einer Ser252Leu-Mutation die Aktivität der Acetylcholinrezeptoren erhöht und dies könnte sowohl bei den „CHRNA4-Patienten“ als auch bei den „FOXP1-Patienten“ zu der geistigen Behinderung beitragen.

Bemerkenswert sind auch zwei unabhängige Studien über α -Synuclein. Zum einen wird in einer Studie von Kurz *et al.* gezeigt, dass in der α -Synuclein^{-/-}-Mauslinie die Expression von *Foxp1* stark reduziert ist (Kurz *et al.*, 2010). Zum anderen zeigen Lui und Kollegen, dass α -Synuclein-Komplexe $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptoren inhibieren (Liu *et al.*, 2013). α -Synuclein wird hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert und liegt vorwiegend frei im Cytoplasma vor. Ungefähr 15 % des α -Synucleins ist in den Neuronen zu jeder Zeit membrangebunden (Iwai *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2002). Aus mehreren Studien geht hervor, dass α -Synuclein in verschiedene zelluläre Prozesse involviert ist. Es interagiert mit Tubulin und mit dem SNARE-Apparat von Vesikeln während der Exocytose (Alim *et al.*, 2002; Chandra *et al.*, 2005). In einer anderen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass α -Synuclein mit dem N-Terminus mit Phospholipiden der Plasmamembran und mit dem C-Terminus mit Synaptobrevin-2, einem Membranproteine sekretorischer Vesikel, interagiert (Burré *et al.*, 2010). In den Gehirnen von Mäusen der α -Synuclein^{-/-}-Mauslinie konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von Dopamin erhöht ist. Daher wird angenommen, dass α -Synuclein ein negativer Regulator der Dopamin-Neurotransmission ist (Abeliovich *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass α -Synuclein im Gehirn die synaptische Plastizität von Synapsen, Lernvorgänge und die Regulation der Dopaminsynthese beeinflusst (Surguchov, 2008). Die Expression von *Foxp1* ist in der α -Synuclein^{-/-}-Mauslinie stark reduziert. Dies wurde auf der Suche nach physiologischen Funktionen von α -Synuclein in Gehirnen von Mäusen der α -Synuclein^{-/-}-Mauslinie aufgedeckt. Diese veränderte Expression wurde im Striatum und im Cerebellum bei Mäusen im postnatalen Alter beobachtet. Es wird spekuliert, dass α -Synuclein und *Foxp1* im Gehirn koreguliert werden und hierbei möglicherweise eine genetische Interaktion eine Rolle spielt (Kurz *et al.*, 2010). Diese Hypothese ist allerdings auf das Mausmodell beschränkt, denn nur im Genom von *Mus musculus* liegen *Foxp1* und α -Synuclein auf dem selben Chromosom (Chromosom 6). Im menschlichen Genom hingegen liegt das *FOXP1*-Gen auf Chromosom 3 und α -Synuclein auf Chromosom 8. Eine andere Möglichkeit, die reduzierte *Foxp1*-Expression in den Gehirnen der α -Synuclein^{-/-}-Mäuse zu erklären ist, dass kernlokalisiertes α -Synuclein einen positiven Einfluss auf die Expression von *Foxp1* hat. Da dieser Einfluss in den α -Synuclein^{-/-}-Mäusen fehlt, könnte dies eine Erklärung für die reduzierte *Foxp1*-Expression sein. In einer aktuellen Studie wurde ein inhibitorischer Einfluss von aggregiertem α -Synuclein auf die Aktivität von $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptoren gezeigt. Es konnte demonstriert werden, dass

α -Synuclein-Komplexe, die größer als 4 nm sind, für diese Inhibition verantwortlich sind. Des Weiteren wurde aufgeklärt, dass dieser inhibitorische Effekt von der Dosis der vorhandenen α -Synuclein-Komplexe abhängig ist (Liu *et al.*, 2013). Bei dieser dosisabhängigen Inhibition spielt aber nicht nur die Menge der vorhandenen α -Synuclein-Komplexe, sondern auch die

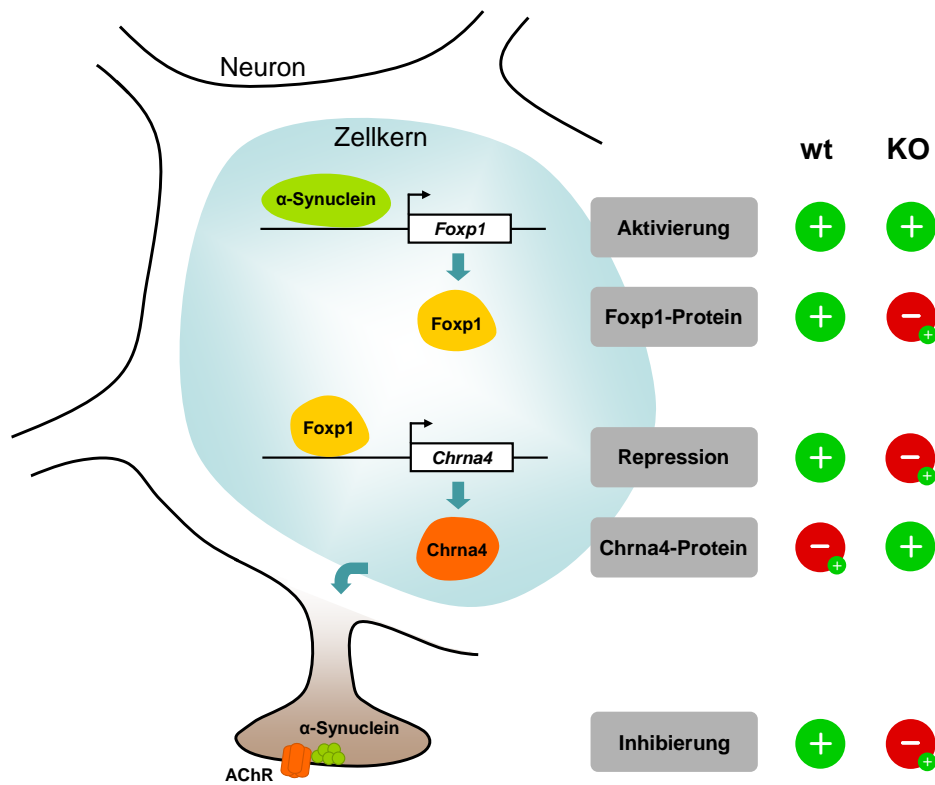


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der α -Synuclein-Foxp1-Chrna4-Hypothese. Dargestellt ist ein Neuron mit Zellkern (blau) und einer Synapse (braun). Diese Hypothese zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen den Daten von Kurz *et al.*, Liu *et al.* und der in dieser Arbeit gezeigten Regulation von *Chrna4* durch Foxp1 (Kurz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). Es wird gezeigt, dass sowohl das kernlokalisierte, also auch das membrangebundene α -Synuclein Einfluss auf die Aktivität des $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptors (AChR) hat. In der rechten Hälfte der Abbildung sind die verschiedenen Schritte dargestellt und zu jedem Schritt mögliche Auswirkungen in den Gehirnen der wt- oder KO-Mäusen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie. Grünes Plus: findet statt bzw. vorhanden; rotes Minus mit kleinem grünen Plus: findet kaum statt bzw. kaum vorhanden.

Anzahl der $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptoren eine Rolle. Die in dieser Arbeit gezeigte Repression von *Chrna4* durch Foxp1 könnte somit den inhibitorischen Effekt der α -Synuclein-Komplexe auf die $\alpha 4\beta 2$ -Acetylcholinrezeptoren beeinflussen. Wäre dies der Fall, dann könnte es in den Gehirnen von wt- und KO-Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie zu unterschiedlichen Situatio-

nen kommen. Diese werden deutlich, wenn man die in Abbildung 5.4 dargestellte Übersicht betrachtet. Wie bereits diskutiert, aktiviert das kernlokalisierte α -Synuclein möglicherweise die Expression von *Foxp1*. In den Gehirnen der wt-Mäuse der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie führt diese Aktivierung zur Synthese von Foxp1-Protein. Dieses bindet, wie in dieser Arbeit gezeigt, an den Promotor des *Chrna4*-Gens. Hierdurch wird die Expression von *Chrna4* reprimiert, wodurch nur wenige Acetylcholinrezeptoren in die Membran eingebaut werden. Dies könnte dazu führen, dass die α -Synuclein-Komplexe, wie von Liu und Kollegen beschrieben, dosisabhängig die Aktivität des Acetylcholinrezeptors inhibieren. In den KO-Mäusen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie hingegen wird kaum Foxp1 exprimiert. Da das Foxp1-Protein-Level im Zellkern niedrig ist, wird die Transkription von *Chrna4* nur vereinzelt von Foxp1 reprimiert. Die translatierten *Chrna4*-Proteine könnten daher in der Membran der Synapse als Untereinheiten von Acetylcholinrezeptoren eingebaut werden. Da in diesem Fall wahrscheinlich genug Acetylcholinrezeptoren vorhanden sind, findet keine dosisabhängige Inhibition durch α -Synuclein-Komplexe statt. Somit ist die Aktivität der Acetylcholinrezeptoren in den KO-Mäusen höher als bei den wt-Mäusen. Dies würde wiederum zu den Vermutungen passen, dass der kognitive Phänotyp der „*CHRNA4*-Patienten“ und der „*FOXP1*-Patienten“ teilweise durch eine erhöhte Aktivität des Acetylcholinrezeptors hervorgerufen wird. Interessanterweise zeigen isolierte α -Synuclein defizitäre Mäuse eine erhöhte Wiedergabe von Ultraschall-Vokalisierungen auf (Kurz *et al.*, 2010). Daher könnte es sein, dass durch die fehlende Aktivierung der *Foxp1*-Expression und der somit nicht stattfindenden Inhibition der Acetylcholinrezeptoren neuronale Kreisläufe beeinflusst werden, die für die Produktion der Ultraschalllaute wichtig sind.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die identifizierten Zielgene, *Pcdh17* und *Chrna4*, im embryonalen Gehirn in Arealen exprimiert sind, welche für diverse kognitive Prozesse, wie beispielsweise die Sprachentwicklung, wichtig sind. Beide Gene kodieren für Proteine, die in Prozesse am synaptischen Spalt involviert sind. Das Zelladhäsionsprotein *Pcdh17* verbindet Synapsen am synaptischen Spalt und das *Chrna4*-Gen kodiert für eine Untereinheit neuronaler Acetylcholinrezeptoren, welche Teil des vorherrschenden Acetylcholinrezeptor-Subtyps im Gehirn ist. Die Expression von *Pcdh17* und auch *Chrna4* wird direkt durch Foxp1 reguliert. Eine Fehlregulationen von *PCDH17* und *CHRNA4* in den Gehirnen von Patienten mit heterozygoten Mutationen im *FOXP1*-Gen könnten daher den kognitiven Phänotyp mit verursachen. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Experimente identifizierten damit die ersten bekannten Zielgene von Foxp1 im Gehirn und tragen zur Aufklärung der molekularen Rolle von Foxp1 während der Gehirnentwicklung bei.

Literaturverzeichnis

- Abeliovich, A, Schmitz, Y, Fariñas, I, Choi-Lundberg, D, Ho, WH, Castillo, PE, Shinsky, N, Verdugo, JM, Armanini, M, Ryan, A, Hynes, M, Phillips, H, Sulzer, D, und Rosenthal, A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1):239–252, 2000. PMID: 10707987.
- Abrahams, BS, Tentler, D, Perederiy, JV, Oldham, MC, Coppola, G, und Geschwind, DH. Genome-wide analyses of human perisylvian cerebral cortical patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45):17849–17854, 2007. PMID: 17978184.
- Alim, MA, Hossain, MS, Arima, K, Takeda, K, Izumiyama, Y, Nakamura, M, Kaji, H, Shinoda, T, Hisanaga, S, und Ueda, K. Tubulin seeds alpha-synuclein fibril formation. *The Journal of biological chemistry*, 277(3):2112–2117, 2002. PMID: 11698390.
- American Psychiatric Association und American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR*. American Psychiatric Association, Washington, DC, 4th ed., text revision edition, 2000.
- Asperger, H. Die autistischen psychopathen im kindesalter. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 117:73–136, 1944.
- Bacon, C und Rappold, GA. The distinct and overlapping phenotypic spectra of FOXP1 and FOXP2 in cognitive disorders. *Human genetics*, 131(11):1687–1698, 2012. PMID: 22736078.
- Bailey, A, Le Couteur, A, Gottesman, I, Bolton, P, Simonoff, E, Yuzda, E, und Rutter, M. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a british twin study. *Psychological medicine*, 25(1):63–77, 1995. PMID: 7792363.
- Baron-Cohen, S, Knickmeyer, RC, und Belmonte, MK. Sex differences in the brain: implications for explaining autism. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5749):819–823, 2005. PMID: 16272115.
- Barrantes, FJ. *The nicotinic acetylcholine receptors: current views and future trends*. Springer; Landes Bioscience, Berlin; New York: Georgetown, TX, 1998.
- Barrera, LO und Ren, B. The transcriptional regulatory code of eukaryotic cells—insights from genome-wide analysis of chromatin organization and transcription factor binding. *Current opinion in cell biology*, 18(3):291–298, 2006. PMID: 16647254.
- Barry, JG, Yasin, I, und Bishop, DVM. Heritable risk factors associated with language impairments. *Genes, brain, and behavior*, 6(1):66–76, 2007. PMID: 17233642.
- Bennett, CL, Christie, J, Ramsdell, F, Brunkow, ME, Ferguson, PJ, Whitesell, L, Kelly, TE, Saulsbury, FT, Chance, PF, und Ochs, HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*, 27(1):20–21, 2001. PMID: 11137993.
- Birmingham, A, Anderson, EM, Reynolds, A, Ilesley-Tyree, D, Leake, D, Fedorov, Y, Baskerville, S, Maksimova, E, Robinson, K, Karpilow, J, Marshall, WS, und Khvorova, A. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nature methods*, 3(3):199–204, 2006. PMID: 16489337.

- Bishop, DVM und Snowling, MJ. Developmental dyslexia and specific language impairment: same or different? *Psychological bulletin*, 130(6):858–886, 2004. PMID: 15535741.
- Bloodstein, O. *A handbook on stuttering*. Thomson/Delmar Learning, Clifton Park, NY, 6th ed edition, 2008.
- Bray, NJ, Kirov, G, Owen, RJ, Jacobsen, NJ, Georgieva, L, Williams, HJ, Norton, N, Spurlock, G, Jones, S, Zammit, S, O'Donovan, MC, und Owen, MJ. Screening the human protocadherin 8 (PCDH8) gene in schizophrenia. *Genes, brain, and behavior*, 1(3):187–191, 2002. PMID: 12884975.
- Brunet, A, Bonni, A, Zigmond, MJ, Lin, MZ, Juo, P, Hu, LS, Anderson, MJ, Arden, KC, Blenis, J, und Greenberg, ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6):857–868, 1999. PMID: 10102273.
- Brunkow, ME, Jeffery, EW, Hjerrild, KA, Paeper, B, Clark, LB, Yasayko, SA, Wilkinson, JE, Galas, D, Ziegler, SF, und Ramsdell, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics*, 27(1):68–73, 2001. PMID: 11138001.
- Burré, J, Sharma, M, Tsetsenis, T, Buchman, V, Etherton, MR, und Südhof, TC. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5999):1663–1667, 2010. PMID: 20798282.
- Burwinkel, B, Shanmugam, KS, Hemminki, K, Meindl, A, Schmutzler, RK, Sutter, C, Wappenschmidt, B, Kiechle, M, Bartram, CR, und Frank, B. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variant is associated with familial breast cancer risk: a case-control study. *BMC cancer*, 6:268, 2006. PMID: 17109766.
- Carr, CW, Moreno-De-Luca, D, Parker, C, Zimmerman, HH, Ledbetter, N, Martin, CL, Dobyens, WB, und Abdul-Rahman, OA. Chiari I malformation, delayed gross motor skills, severe speech delay, and epileptiform discharges in a child with FOXP1 haploinsufficiency. *European journal of human genetics: EJHG*, 18(11):1216–1220, 2010. PMID: 20571508.
- Chae, WJ, Henegariu, O, Lee, SK, und Bothwell, ALM. The mutant leucine-zipper domain impairs both dimerization and suppressive function of foxp3 in T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25):9631–9636, 2006. PMID: 16769892.
- Chandra, S, Gallardo, G, Fernández-Chacón, R, Schlüter, OM, und Südhof, TC. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*, 123(3):383–396, 2005. PMID: 16269331.
- Chen, X, Xu, H, Yuan, P, Fang, F, Huss, M, Vega, VB, Wong, E, Orlov, YL, Zhang, W, Jiang, J, Loh, YH, Yeo, HC, Yeo, ZX, Narang, V, Govindarajan, KR, Leong, B, Shahab, A, Ruan, Y, Bourque, G, Sung, WK, Clarke, ND, Wei, CL, und Ng, HH. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*, 133(6):1106–1117, 2008. PMID: 18555785.
- Cho, YW, Motamedi, GK, Laufenberg, I, Sohn, SI, Lim, JG, Lee, H, Yi, SD, Lee, JH, Kim, DK, Reba, R, Gaillard, WD, Theodore, WH, Lesser, RP, und Steinlein, OK. A Korean kindred with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and mental retardation. *Archives of neurology*, 60(11):1625–1632, 2003. PMID: 14623738.
- Chokas, AL, Trivedi, CM, Lu, MM, Tucker, PW, Li, S, Epstein, JA, und Morrissey, EE. Foxp1/2/4-NuRD interactions regulate gene expression and epithelial injury response in the lung via regulation of interleukin-6. *The Journal of biological chemistry*, 285(17):13304–13313, 2010. PMID: 20185820.

- Chung, S, Shin, BS, Hwang, M, Lardaro, T, Kang, UJ, Isacson, O, und Kim, KS. Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion in vitro. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(6):1583–1593, 2006. PMID: 16543488.
- Clark, A, O'Hare, A, Watson, J, Cohen, W, Cowie, H, Elton, R, Nasir, J, und Seckl, J. Severe receptive language disorder in childhood—familial aspects and long-term outcomes: results from a scottish study. *Archives of disease in childhood*, 92(7):614–619, 2007. PMID: 17405857.
- Clark, KL, Halay, ED, Lai, E, und Burley, SK. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone h5. *Nature*, 364(6436):412–420, 1993. PMID: 8332212.
- Conti-Ramsden, G, Falcaro, M, Simkin, Z, und Pickles, A. Familial loading in specific language impairment: patterns of differences across proband characteristics, gender and relative type. *Genes, brain, and behavior*, 6(3):216–228, 2007. PMID: 16827920.
- Davis, TJ und de Fiebre, CM. Alcohol's actions on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 29(3):179–185, 2006. PMID: 17373406.
- Dean, B, Keriakous, D, Scarr, E, und Thomas, EA. Gene expression profiling in brodmann's area 46 from subjects with schizophrenia. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 41(4):308–320, 2007. PMID: 17464717.
- Diamond, A. Close interrelation of motor development and cognitive development and of the cerebellum and prefrontal cortex. *Child development*, 71(1):44–56, 2000. PMID: 10836557.
- Dibbens, LM, Tarpey, PS, Hynes, K, Bayly, MA, Scheffer, IE, Smith, R, Bomar, J, Sutton, E, Vandeleur, L, Shoubridge, C, Edkins, S, Turner, SJ, Stevens, C, O'Meara, S, Tofts, C, Barthorpe, S, Buck, G, Cole, J, Halliday, K, Jones, D, Lee, R, Madison, M, Mironenko, T, Varian, J, West, S, Widaa, S, Wray, P, Teague, J, Dicks, E, Butler, A, Menzies, A, Jenkinson, A, Shepherd, R, Gusella, JF, Afawi, Z, Mazarib, A, Neufeld, MY, Kivity, S, Lev, D, Lerman-Sagie, T, Korczyn, AD, Derry, CP, Sutherland, GR, Friend, K, Shaw, M, Corbett, M, Kim, HG, Geschwind, DH, Thomas, P, Haan, E, Ryan, S, McKee, S, Berkovic, SF, Futreal, PA, Stratton, MR, Mulley, JC, und Géczy, J. X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nature genetics*, 40(6):776–781, 2008. PMID: 18469813.
- El Sabbagh, M, Divan, G, Koh, YJ, Kim, YS, Kauchali, S, Marcín, C, Montiel-Nava, C, Patel, V, Paula, CS, Wang, C, Yasamy, MT, und Fombonne, E. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research*, 5(3):160–179, 2012. PMID: 22495912.
- Emison, ES, McCallion, AS, Kashuk, CS, Bush, RT, Grice, E, Lin, S, Portnoy, ME, Cutler, DJ, Green, ED, und Chakravarti, A. A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies hirschsprung disease risk. *Nature*, 434(7035):857–863, 2005. PMID: 15829955.
- Fenton, JAL, Schuurin, E, Barrans, SL, Banham, AH, Rollinson, SJ, Morgan, GJ, Jack, AS, van Krieken, JHJM, und Kluin, PM. t(3;14)(p14;q32) results in aberrant expression of FOXP1 in a case of diffuse large b-cell lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer*, 45(2):164–168, 2006. PMID: 16252263.
- Ferland, RJ, Cherry, TJ, Preware, PO, Morrissey, EE, und Walsh, CA. Characterization of foxp2 and foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *The Journal of comparative neurology*, 460(2):266–279, 2003. PMID: 12687690.

- Fire, A, Xu, S, Montgomery, MK, Kostas, SA, Driver, SE, und Mello, CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–811, 1998. PMID: 9486653.
- Fisher, SE. Molecular windows into speech and language disorders. *Folia phoniatrica et logopaedica: official organ of the International Association of Logopedics and Phoniatrics (IALP)*, 59(3):130–140, 2007. PMID: 17556856.
- Fisher, SE und DeFries, JC. Developmental dyslexia: genetic dissection of a complex cognitive trait. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(10):767–780, 2002. PMID: 12360321.
- Fisher, SE, Vargha-Khadem, F, Watkins, KE, Monaco, AP, und Pembrey, ME. Localisation of a gene implicated in a severe speech and language disorder. *Nature genetics*, 18(2):168–170, 1998. PMID: 9462748.
- Flores, CM, Rogers, SW, Pabreza, LA, Wolfe, BB, und Kellar, KJ. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Molecular pharmacology*, 41(1):31–37, 1992. PMID: 1732720.
- Frints, SGM, Froyen, G, Marynen, P, und Fryns, JP. X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clinical genetics*, 62(6):423–432, 2002. PMID: 12485186.
- Furey, TS. ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nature reviews. Genetics*, 13(12):840–852, 2012. PMID: 23090257.
- Gabut, M, Samavarchi-Tehrani, P, Wang, X, Slobodeniuc, V, O'Hanlon, D, Sung, HK, Alvarez, M, Talukder, S, Pan, Q, Mazzone, EO, Nedelec, S, Wichterle, H, Woltjen, K, Hughes, TR, Zandstra, PW, Nagy, A, Wrana, JL, und Blencowe, BJ. An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell*, 147(1):132–146, 2011. PMID: 21924763.
- Gillberg, C, Cederlund, M, Lamberg, K, und Zeijlon, L. Brief report: "the autism epidemic". the registered prevalence of autism in a swedish urban area. *Journal of autism and developmental disorders*, 36(3):429–435, 2006. PMID: 16568356.
- Gregório, SP, Sallet, PC, Do, KA, Lin, E, Gattaz, WF, und Dias-Neto, E. Polymorphisms in genes involved in neurodevelopment may be associated with altered brain morphology in schizophrenia: preliminary evidence. *Psychiatry research*, 165(1-2):1–9, 2009. PMID: 19054571.
- Guilmatre, A, Dubourg, C, Mosca, AL, Legallic, S, Goldenberg, A, Drouin-Garraud, V, Layet, V, Rosier, A, Briault, S, Bonnet-Brilhault, F, Laumonnier, F, Odent, S, Le Vacon, G, Joly-Helas, G, David, V, Bendavid, C, Pinoit, JM, Henry, C, Impallomeni, C, Germano, E, Tortorella, G, Di Rosa, G, Barthelemy, C, Andres, C, Faivre, L, Frébourg, T, Saugier Veber, P, und Champion, D. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Archives of general psychiatry*, 66(9):947–956, 2009. PMID: 19736351.
- Hamdan, FF, Daoud, H, Piton, A, Gauthier, J, Dobrzyńska, S, Krebs, MO, Joober, R, Lacaille, JC, Nadeau, A, Milunsky, JM, Wang, Z, Carmant, L, Mottron, L, Beauchamp, MH, Rouleau, GA, und Michaud, JL. De novo SYNGAP1 mutations in nonsyndromic intellectual disability and autism. *Biological psychiatry*, 69(9):898–901, 2011. PMID: 21237447.
- Hamdan, FF, Daoud, H, Rochefort, D, Piton, A, Gauthier, J, Langlois, M, Foomani, G, Dobrzyńska, S, Krebs, MO, Joober, R, Lafrenière, RG, Lacaille, JC, Mottron, L, Drapeau, P, Beauchamp, MH, Phillips,

- MS, Fombonne, E, Rouleau, GA, und Michaud, JL. De novo mutations in FOXP1 in cases with intellectual disability, autism, and language impairment. *American journal of human genetics*, 87(5):671–678, 2010. PMID: 20950788.
- Hamdan, FF, Gauthier, J, Spiegelman, D, Noreau, A, Yang, Y, Pellerin, S, Dobrzeniecka, S, Côté, M, Perreault-Linck, E, Perreault-Linck, E, Carmant, L, D'Anjou, G, Fombonne, E, Addington, AM, Rapoport, JL, Delisi, LE, Krebs, MO, Mouaffak, F, Joobar, R, Mottron, L, Drapeau, P, Marineau, C, Lafrenière, RG, Lacaille, JC, Rouleau, GA, Michaud, JL, und Synapse to Disease Group. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *The New England journal of medicine*, 360(6):599–605, 2009. PMID: 19196676.
- Hannula-Jouppi, K, Kaminen-Ahola, N, Taipale, M, Eklund, R, Nopola-Hemmi, J, Kääriäinen, H, und Kere, J. The axon guidance receptor gene ROBO1 is a candidate gene for developmental dyslexia. *PLoS genetics*, 1(4):e50, 2005. PMID: 16254601.
- Harold, D, Paracchini, S, Scerri, T, Dennis, M, Cope, N, Hill, G, Moskvina, V, Walter, J, Richardson, AJ, Owen, MJ, Stein, JF, Green, ED, O'Donovan, MC, Williams, J, und Monaco, AP. Further evidence that the KIAA0319 gene confers susceptibility to developmental dyslexia. *Molecular psychiatry*, 11(12):1085–1091, 1061, 2006. PMID: 17033633.
- Heller, T. Über dementia infantilis. *Zeitschrift für die Erforschung und Behandlung des jugendlichen Schwachsinnns auf wissenschaftlicher Grundlage*, 2:17–28, 1908.
- Hirano, S, Suzuki, ST, und Redies, C. The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 8:d306–355, 2003. PMID: 12456358.
- Hirano, S und Takeichi, M. Cadherins in brain morphogenesis and wiring. *Physiological reviews*, 92(2):597–634, 2012. PMID: 22535893.
- Hirano, S, Yan, Q, und Suzuki, ST. Expression of a novel protocadherin, OL-protocadherin, in a subset of functional systems of the developing mouse brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(3):995–1005, 1999. PMID: 9920663.
- Horn, D, Kapeller, J, Rivera-Brugués, N, Moog, U, Lorenz-Depiereux, B, Eck, S, Hempel, M, Wagenstaller, J, Gawthrop, A, Monaco, AP, Bonin, M, Riess, O, Wohlleber, E, Illig, T, Bezzina, CR, Franke, A, Spranger, S, Villavicencio-Lorini, P, Seifert, W, Rosenfeld, J, Klopocki, E, Rappold, GA, und Strom, TM. Identification of FOXP1 deletions in three unrelated patients with mental retardation and significant speech and language deficits. *Human mutation*, 31(11):E1851–1860, 2010. PMID: 20848658.
- Hu, MCT, Lee, DF, Xia, W, Golfman, LS, Ou-Yang, F, Yang, JY, Zou, Y, Bao, S, Hanada, N, Saso, H, Kobayashi, R, und Hung, MC. I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*, 117(2):225–237, 2004. PMID: 15084260.
- Hurst, JA, Baraitser, M, Auger, E, Graham, F, und Norell, S. An extended family with a dominantly inherited speech disorder. *Developmental medicine and child neurology*, 32(4):352–355, 1990. PMID: 2332125.
- Hutvagner, G und Zamore, PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Current opinion in genetics & development*, 12(2):225–232, 2002. PMID: 11893497.
- Hynes, K, Tarpey, P, Dibbens, LM, Bayly, MA, Berkovic, SF, Smith, R, Raisi, ZA, Turner, SJ, Brown, NJ, Desai, TD, Haan, E, Turner, G, Christodoulou, J, Leonard, H, Gill, D, Stratton, MR, Gecz, J, und Scheffer,

- IE. Epilepsy and mental retardation limited to females with PCDH19 mutations can present de novo or in single generation families. *Journal of medical genetics*, 47(3):211–216, 2010. PMID: 19752159.
- Iwai, A, Masliah, E, Yoshimoto, M, Ge, N, Flanagan, L, de Silva, HA, Kittel, A, und Saitoh, T. The precursor protein of non-a beta component of alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*, 14(2):467–475, 1995. PMID: 7857654.
- Jamal, SM, Basran, RK, Newton, S, Wang, Z, und Milunsky, JM. Novel de novo PCDH19 mutations in three unrelated females with epilepsy female restricted mental retardation syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 152A(10):2475–2481, 2010. PMID: 20830798.
- Jepsen, K, Gleiberman, AS, Shi, C, Simon, DI, und Rosenfeld, MG. Cooperative regulation in development by SMRT and FOXP1. *Genes & development*, 22(6):740–745, 2008. PMID: 18347093.
- Jimenez-Sanchez, G, Childs, B, und Valle, D. Human disease genes. *Nature*, 409(6822):853–855, 2001. PMID: 11237009.
- Kanehisa, M und Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1):27–30, 2000. PMID: 10592173.
- Kanehisa, M, Goto, S, Sato, Y, Furumichi, M, und Tanabe, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic acids research*, 40(Database issue):D109–114, 2012. PMID: 22080510.
- Kaner, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, (2):217–250, 1943.
- Kang, C, Riazuddin, S, Mundorff, J, Krasnewich, D, Friedman, P, Mullikin, JC, und Drayna, D. Mutations in the lysosomal enzyme-targeting pathway and persistent stuttering. *The New England journal of medicine*, 362(8):677–685, 2010. PMID: 20147709.
- Kathiresan, S, Voight, BF, Purcell, S, Musunuru, K, Ardissino, D, Mannucci, PM, Anand, S, Engert, JC, Samani, NJ, Schunkert, H, Erdmann, J, Reilly, MP, Rader, DJ, Morgan, T, Spertus, JA, Stoll, M, Girelli, D, McKeown, PP, Patterson, CC, Siscovick, DS, O'Donnell, CJ, Elosua, R, Peltonen, L, Salomaa, V, Schwartz, SM, Melander, O, Altshuler, D, Ardissino, D, Merlini, PA, Berzuini, C, Bernardinelli, L, Peyvandi, F, Tubaro, M, Celli, P, Ferrario, M, Faveau, R, Marziliano, N, Casari, G, Galli, M, Ribichini, F, Rossi, M, Bernardi, F, Zoncin, P, Piazza, A, Mannucci, PM, Schwartz, SM, Siscovick, DS, Yee, J, Friedlander, Y, Elosua, R, Marrugat, J, Lucas, G, Subirana, I, Sala, J, Ramos, R, Kathiresan, S, Meigs, JB, Williams, G, Nathan, DM, MacRae, CA, O'Donnell, CJ, Salomaa, V, Havulinna, AS, Peltonen, L, Melander, O, Berglund, G, Voight, BF, Kathiresan, S, Hirschhorn, JN, Asselta, R, Duga, S, Sreafico, M, Musunuru, K, Daly, MJ, Purcell, S, Voight, BF, Purcell, S, Nemes, J, Korn, JM, McCarroll, SA, Schwartz, SM, Yee, J, Kathiresan, S, Lucas, G, Subirana, I, Elosua, R, Surti, A, Guiducci, C, Gianniny, L, Mirel, D, Parkin, M, Burt, N, Gabriel, SB, Samani, NJ, Thompson, JR, Braund, PS, Wright, BJ, Balmforth, AJ, Ball, SG, Hall, AS, Schunkert, H, Erdmann, J, Linsel-Nitschke, P, Lieb, W, Ziegler, A, König, I, Hengstenberg, C, Fischer, M, Stark, K, Grosshennig, A, Preuss, M, Wichmann, HE, Schreiber, S, Schunkert, H, Samani, NJ, Erdmann, J, Ouwehand, W, Hengstenberg, C, Deloukas, P, Scholz, M, Cambien, F, Reilly, MP, Li, M, Chen, Z, Wilensky, R, Matthaï, W, Qasim, A, Hakonarson, HH, Devaney, J, Burnett, MS, Pichard, AD, Kent, KM, Satler, L, Lindsay, JM, Waksman, R, Knouff, CW, Waterworth, DM, Walker, MC, Mooser, V, Epstein, SE, Rader, DJ, Scheffold, T, Berger, K, Stoll, M, Häge, A, Girelli, D, Martinelli, N, Olivieri, O, Corrocher, R, Morgan, T, Spertus, JA, McKeown, P, Patterson, CC, Schunkert, H, Erdmann, E, Linsel-Nitschke, P, Lieb, W, Ziegler, A, König, IR, Hengstenberg, C, Fischer, M, Stark, K, Grosshennig, A, Preuss, M, Wichmann, HE, Schreiber, S, Hólm, H, Thorleifsson, G, Thorsteinsdóttir, U, Stefansson, K, Engert,

- JC, Do, R, Xie, C, Anand, S, Kathiresan, S, Ardissino, D, Mannucci, PM, Siscovick, D, O'Donnell, CJ, Samani, NJ, Melander, O, Elosua, R, Peltonen, L, Salomaa, V, Schwartz, SM, und Altshuler, D. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics*, 41(3):334–341, 2009. PMID: 19198609.
- Kim, SY, Chung, HS, Sun, W, und Kim, H. Spatiotemporal expression pattern of non-clustered protocadherin family members in the developing rat brain. *Neuroscience*, 147(4):996–1021, 2007. PMID: 17614211.
- Kinsbourne, M und Graf, W. Disorders of mental development. In *Child Neurology*, page pp. 1155 – 1211. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.
- Klaassen, A, Glykys, J, Maguire, J, Labarca, C, Mody, I, und Boulter, J. Seizures and enhanced cortical GABAergic inhibition in two mouse models of human autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50):19152–19157, 2006. PMID: 17146052.
- Konopka, G, Bomar, JM, Winden, K, Coppola, G, Jonsson, ZO, Gao, F, Peng, S, Preuss, TM, Wohlschlegel, JA, und Geschwind, DH. Human-specific transcriptional regulation of CNS development genes by FOXP2. *Nature*, 462(7270):213–217, 2009. PMID: 19907493.
- Konstantoulas, CJ, Parmar, M, und Li, M. FoxP1 promotes midbrain identity in embryonic stem cell-derived dopamine neurons by regulating pitx3. *Journal of neurochemistry*, 113(4):836–847, 2010. PMID: 20175877.
- Kranz, AL, Eils, R, und Konig, R. Enhancers regulate progression of development in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 39(20):8689–8702, 2011. PMID: 21785139 PMCID: PMC3203619.
- Kurz, A, Wöhr, M, Walter, M, Bonin, M, Auburger, G, Gispert, S, und Schwarting, RKW. Alpha-synuclein deficiency affects brain foxp1 expression and ultrasonic vocalization. *Neuroscience*, 166(3):785–795, 2010. PMID: 20056137.
- Lai, CS, Fisher, SE, Hurst, JA, Vargha-Khadem, F, und Monaco, AP. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*, 413(6855):519–523, 2001. PMID: 11586359.
- Lalmansingh, AS, Karmakar, S, Jin, Y, und Nagaich, AK. Multiple modes of chromatin remodeling by forkhead box proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1819(7):707–715, 2012. PMID: 22406422.
- Lander, ES, Linton, LM, Birren, B, Nusbaum, C, Zody, MC, Baldwin, J, Devon, K, Dewar, K, Doyle, M, FitzHugh, W, Funke, R, Gage, D, Harris, K, Heaford, A, Howland, J, Kann, L, Lehoczky, J, LeVine, R, McEwan, P, McKernan, K, Meldrim, J, Mesirov, JP, Miranda, C, Morris, W, Naylor, J, Raymond, C, Rosetti, M, Santos, R, Sheridan, A, Sougnez, C, Stange-Thomann, N, Stojanovic, N, Subramanian, A, Wyman, D, Rogers, J, Sulston, J, Ainscough, R, Beck, S, Bentley, D, Burton, J, Clee, C, Carter, N, Coulson, A, Deadman, R, Deloukas, P, Dunham, A, Dunham, I, Durbin, R, French, L, Grafham, D, Gregory, S, Hubbard, T, Humphray, S, Hunt, A, Jones, M, Lloyd, C, McMurray, A, Matthews, L, Mercer, S, Milne, S, Mullikin, JC, Mungall, A, Plumb, R, Ross, M, Shownkeen, R, Sims, S, Waterston, RH, Wilson, RK, Hillier, LW, McPherson, JD, Marra, MA, Mardis, ER, Fulton, LA, Chinwalla, AT, Pepin, KH, Gish, WR, Chissole, SL, Wendl, MC, Delehaunty, KD, Miner, TL, Delehaunty, A, Kramer, JB, Cook, LL, Fulton, RS, Johnson, DL, Minx, PJ, Clifton, SW, Hawkins, T, Branscomb, E, Predki, P, Richardson, P, Wenning, S, Slezak, T, Doggett, N, Cheng, JF, Olsen, A, Lucas, S, Elkin, C, Uberbacher, E, Frazier, M, Gibbs, RA, Muzny, DM, Scherer, SE, Bouck, JB, Sodergren, EJ, Worley, KC, Rives, CM, Gorrell, JH, Metzker, ML, Naylor, SL, Kucherlapati, RS, Nelson, DL, Weinstock, GM, Sakaki, Y, Fujiiyama, A, Hattori, M, Yada, T, Toyoda, A, Itoh, T, Kawagoe, C, Watanabe, H, Totoki, Y, Taylor, T, Weissenbach, J, Heilig, R, Saurin,

- W, Artiguenave, F, Brottier, P, Bruls, T, Pelletier, E, Robert, C, Wincker, P, Smith, DR, Doucette-Stamm, L, Rubenfield, M, Weinstock, K, Lee, HM, Dubois, J, Rosenthal, A, Platzer, M, Nyakatura, G, Taudien, S, Rump, A, Yang, H, Yu, J, Wang, J, Huang, G, Gu, J, Hood, L, Rowen, L, Madan, A, Qin, S, Davis, RW, Federspiel, NA, Abola, AP, Proctor, MJ, Myers, RM, Schmutz, J, Dickson, M, Grimwood, J, Cox, DR, Olson, MV, Kaul, R, Raymond, C, Shimizu, N, Kawasaki, K, Minoshima, S, Evans, GA, Athanasiou, M, Schultz, R, Roe, BA, Chen, F, Pan, H, Ramser, J, Lehrach, H, Reinhardt, R, McCombie, WR, de la Bastide, M, Dedhia, N, Blöcker, H, Hornischer, K, Nordsiek, G, Agarwala, R, Aravind, L, Bailey, JA, Bateman, A, Batzoglu, S, Birney, E, Bork, P, Brown, DG, Burge, CB, Cerutti, L, Chen, HC, Church, D, Clamp, M, Copley, RR, Doerks, T, Eddy, SR, Eichler, EE, Furey, TS, Galagan, J, Gilbert, JG, Harmon, C, Hayashizaki, Y, Haussler, D, Hermjakob, H, Hokamp, K, Jang, W, Johnson, LS, Jones, TA, Kasif, S, Kasprzyk, A, Kennedy, S, Kent, WJ, Kitts, P, Koonin, EV, Korf, I, Kulp, D, Lancet, D, Lowe, TM, McLysaght, A, Mikkelsen, T, Moran, JV, Mulder, N, Pollara, VJ, Ponting, CP, Schuler, G, Schultz, J, Slater, G, Smit, AF, Stupka, E, Szustakowski, J, Thierry-Mieg, D, Thierry-Mieg, J, Wagner, L, Wallis, J, Wheeler, R, Williams, A, Wolf, YI, Wolfe, KH, Yang, SP, Yeh, RF, Collins, F, Guyer, MS, Peterson, J, Felsenfeld, A, Wetterstrand, KA, Patrinos, A, Morgan, MJ, de Jong, P, Catanese, JJ, Osoegawa, K, Shizuya, H, Choi, S, Chen, YJ, und Szustakowski, J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921, 2001. PMID: 11237011.
- Lee, HJ, Choi, C, und Lee, SJ. Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *The Journal of biological chemistry*, 277(1):671–678, 2002. PMID: 11679584.
- Lee, TI und Young, RA. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, 152(6):1237–1251, 2013. PMID: 23498934.
- Leonard, H und Wen, X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 8(3):117–134, 2002. PMID: 12216056.
- Lettice, LA, Heaney, SJH, Purdie, LA, Li, L, de Beer, P, Oostra, BA, Goode, D, Elgar, G, Hill, RE, und de Graaff, E. A long-range shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Human molecular genetics*, 12(14):1725–1735, 2003. PMID: 12837695.
- Lewis, BA, Freebairn, LA, Hansen, AJ, Miscimarra, L, Iyengar, SK, und Taylor, HG. Speech and language skills of parents of children with speech sound disorders. *American journal of speech-language pathology / American Speech-Language-Hearing Association*, 16(2):108–118, 2007. PMID: 17456889.
- Li, B, Samanta, A, Song, X, Iacono, KT, Bembas, K, Tao, R, Basu, S, Riley, JL, Hancock, WW, Shen, Y, Saouaf, SJ, und Greene, MI. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11):4571–4576, 2007. PMID: 17360565.
- Li, S, Weidenfeld, J, und Morrissey, EE. Transcriptional and DNA binding activity of the foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Molecular and cellular biology*, 24(2):809–822, 2004. PMID: 14701752.
- Lieberman, P. On the nature and evolution of the neural bases of human language. *American journal of physical anthropology*, Suppl 35:36–62, 2002. PMID: 12653308.
- Lin, X, Ruan, X, Anderson, MG, McDowell, JA, Kroeger, PE, Fesik, SW, und Shen, Y. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic acids research*, 33(14):4527–4535, 2005. PMID: 16091630.

- Lintas, C und Persico, AM. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *Journal of medical genetics*, 46(1):1–8, 2009. PMID: 18728070.
- Liu, Q, Emadi, S, Shen, JX, Sierks, MR, und Wu, J. Human alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor as a novel target of oligomeric alpha-synuclein. *PloS one*, 8(2):e55886, 2013. PMID: 23437071.
- Lu, MM, Li, S, Yang, H, und Morrisey, EE. Foxp4: a novel member of the foxp subfamily of winged-helix genes co-expressed with foxp1 and foxp2 in pulmonary and gut tissues. *Gene expression patterns: GEP*, 2(3-4):223–228, 2002. PMID: 12617805.
- Ma, RYM, Tong, THK, Leung, WY, und Yao, KM. Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 647:113–123, 2010. PMID: 20694663.
- MacDermot, KD, Bonora, E, Sykes, N, Coupe, AM, Lai, CSL, Vernes, SC, Vargha-Khadem, F, McKenzie, F, Smith, RL, Monaco, AP, und Fisher, SE. Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. *American journal of human genetics*, 76(6):1074–1080, 2005. PMID: 15877281.
- Markett, S, Montag, C, Walter, NT, und Reuter, M. Evidence for the modality independence of the genetic epistasis between the dopaminergic and cholinergic system on working memory capacity. *European neuro-psychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 21(2):216–220, 2011. PMID: 21130611.
- Maston, GA, Evans, SK, und Green, MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual review of genomics and human genetics*, 7:29–59, 2006. PMID: 16719718.
- Maxwell, SL, Ho, HY, Kuehner, E, Zhao, S, und Li, M. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Developmental biology*, 282(2):467–479, 2005. PMID: 15950611.
- McLaren, J und Bryson, SE. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *American journal of mental retardation: AJMR*, 92(3):243–254, 1987. PMID: 3322329.
- Meng, H, Smith, SD, Hager, K, Held, M, Liu, J, Olson, RK, Pennington, BF, DeFries, JC, Gelernter, J, O'Reilly-Pol, T, Somlo, S, Skudlarski, P, Shaywitz, SE, Shaywitz, BA, Marchione, K, Wang, Y, Paramasivam, M, LoTurco, JJ, Page, GP, und Gruen, JR. DCDC2 is associated with reading disability and modulates neuronal development in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47):17053–17058, 2005. PMID: 16278297.
- Morris, RD, Stuebing, KK, Fletcher, JM, Shaywitz, SE, Lyon, GR, Shankweiler, DP, Katz, L, Francis, DJ, und Shaywitz, BA. Subtypes of reading disability: Variability around a phonological core. *Journal of Educational Psychology*, 90(3):347–373, 1998.
- Morrow, EM, Yoo, SY, Flavell, SW, Kim, TK, Lin, Y, Hill, RS, Mukaddes, NM, Balkhy, S, Gascon, G, Hashmi, A, Al-Saad, S, Ware, J, Joseph, RM, Greenblatt, R, Gleason, D, Ertelt, JA, Apse, KA, Bodell, A, Partlow, JN, Barry, B, Yao, H, Markianos, K, Ferland, RJ, Greenberg, ME, und Walsh, CA. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5886):218–223, 2008. PMID: 18621663.

- Nakajima, D, Nakayama, M, Kikuno, R, Hirosawa, M, Nagase, T, und Ohara, O. Identification of three novel non-classical cadherin genes through comprehensive analysis of large cDNAs. *Brain research. Molecular brain research*, 94(1-2):85–95, 2001. PMID: 11597768.
- Nollet, F, Kools, P, und van Roy, F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of molecular biology*, 299(3):551–572, 2000. PMID: 10835267.
- O’Roak, BJ, Deriziotis, P, Lee, C, Vives, L, Schwartz, JJ, Girirajan, S, Karakoc, E, Mackenzie, AP, Ng, SB, Baker, C, Rieder, MJ, Nickerson, DA, Bernier, R, Fisher, SE, Shendure, J, und Eichler, EE. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature genetics*, 43(6):585–589, 2011. PMID: 21572417.
- Palumbo, O, D’Agruma, L, Minenna, AF, Palumbo, P, Stallone, R, Palladino, T, Zelante, L, und Carella, M. 3p14.1 de novo microdeletion involving the FOXP1 gene in an adult patient with autism, severe speech delay and deficit of motor coordination. *Gene*, 516(1):107–113, 2013. PMID: 23287644.
- Pariani, MJ, Spencer, A, Graham, J, John M, und Rimoin, DL. A 785kb deletion of 3p14.1p13, including the FOXP1 gene, associated with speech delay, contractures, hypertonia and blepharophimosis. *European journal of medical genetics*, 52(2-3):123–127, 2009. PMID: 19332160.
- Park, PJ. CHIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature reviews. Genetics*, 10(10):669–680, 2009. PMID: 19736561.
- Peça, J und Feng, G. Cellular and synaptic network defects in autism. *Current opinion in neurobiology*, 22(5):866–872, 2012. PMID: 22440525.
- Picciotto, MR, Zoli, M, Léna, C, Bessis, A, Lallemand, Y, Le Novère, N, Vincent, P, Pich, EM, Brûlet, P, und Changeux, JP. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature*, 374(6517):65–67, 1995. PMID: 7870173.
- Rahimov, F, Marazita, ML, Visel, A, Cooper, ME, Hitchler, MJ, Rubini, M, Domann, FE, Govil, M, Christensen, K, Bille, C, Melbye, M, Jugessur, A, Lie, RT, Wilcox, AJ, Fitzpatrick, DR, Green, ED, Mossey, PA, Little, J, Steegers-Theunissen, RP, Pennacchio, LA, Schutte, BC, und Murray, JC. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nature genetics*, 40(11):1341–1347, 2008. PMID: 18836445.
- Rauch, A, Hoyer, J, Guth, S, Zweier, C, Kraus, C, Becker, C, Zenker, M, Hüffmeier, U, Thiel, C, Rüschenhoff, F, Nürnberg, P, Reis, A, und Trautmann, U. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *American journal of medical genetics. Part A*, 140(19):2063–2074, 2006. PMID: 16917849.
- Redies, C. Cadherins in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, 61(6):611–648, 2000. PMID: 10775799.
- Redies, C, Heyder, J, Kohoutek, T, Staes, K, und Van Roy, F. Expression of protocadherin-1 (pcdh1) during mouse development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(9):2496–2505, 2008. PMID: 18729229.
- Redies, C, Vanhalst, K, und Roy, Fv. delta-protocadherins: unique structures and functions. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 62(23):2840–2852, 2005. PMID: 16261259.

- Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. i. multilocus models. *American journal of human genetics*, 46(2):222–228, 1990. PMID: 2301392.
- Risch, N, Spiker, D, Lotspeich, L, Nouri, N, Hinds, D, Hallmayer, J, Kalaydjieva, L, McCague, P, Dimiceli, S, Pitts, T, Nguyen, L, Yang, J, Harper, C, Thorpe, D, Vermeer, S, Young, H, Hebert, J, Lin, A, Ferguson, J, Chiotti, C, Wiese-Slater, S, Rogers, T, Salmon, B, Nicholas, P, Petersen, PB, Pingree, C, McMahon, W, Wong, DL, Cavalli-Sforza, LL, Kraemer, HC, und Myers, RM. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *American journal of human genetics*, 65(2):493–507, 1999. PMID: 10417292.
- Ritvo, ER, Freeman, BJ, Mason-Brothers, A, Mo, A, und Ritvo, AM. Concordance for the syndrome of autism in 40 pairs of afflicted twins. *The American journal of psychiatry*, 142(1):74–77, 1985. PMID: 4038442.
- Sakabe, NJ und Nobrega, MA. Genome-wide maps of transcription regulatory elements. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 2(4):422–437, 2010. PMID: 20836039.
- Sandelin, A, Carninci, P, Lenhard, B, Ponjavic, J, Hayashizaki, Y, und Hume, DA. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nature reviews. Genetics*, 8(6):424–436, 2007. PMID: 17486122.
- Südhof, TC. Neuroligins and neuexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455(7215):903–911, 2008. PMID: 18923512.
- Sharp, PA. RNA interference–2001. *Genes & development*, 15(5):485–490, 2001. PMID: 11238371.
- Shu, W, Yang, H, Zhang, L, Lu, MM, und Morrissey, EE. Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. *The Journal of biological chemistry*, 276(29):27488–27497, 2001. PMID: 11358962.
- Simms, MD. Language disorders in children: classification and clinical syndromes. *Pediatric clinics of North America*, 54(3):437–467, v, 2007. PMID: 17543904.
- Smidt, MP, van Schaick, HS, Lanctôt, C, Tremblay, JJ, Cox, JJ, van der Kleij, AA, Wolterink, G, Drouin, J, und Burbach, JP. A homeodomain gene ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24):13305–13310, 1997. PMID: 9371841.
- Snowling, MJ. From language to reading and dyslexia1. *Dyslexia*, 7(1):37–46, 2001.
- Strachan, T und Read, AP. *Molekulare Humangenetik*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg; Berlin; Oxford, 1996.
- Surguchov, A. Molecular and cellular biology of synucleins. *International review of cell and molecular biology*, 270:225–317, 2008. PMID: 19081538.
- Takeichi, M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 102(4):639–655, 1988. PMID: 3048970.
- Takeichi, M. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(1):11–20, 2007. PMID: 17133224.
- Tang, B, Becanovic, K, Desplats, PA, Spencer, B, Hill, AM, Connolly, C, Masliah, E, Leavitt, BR, und Thomas, EA. Forkhead box protein p1 is a transcriptional repressor of immune signaling in the CNS: implications for transcriptional dysregulation in huntington disease. *Human molecular genetics*, 21(14):3097–3111, 2012. PMID: 22492998.

- Tomblin, JB, Records, NL, Buckwalter, P, Zhang, X, Smith, E, und O'Brien, M. Prevalence of specific language impairment in kindergarten children. *Journal of speech, language, and hearing research: JSLHR*, 40(6):1245–1260, 1997. PMID: 9430746.
- Tronche, F, Kellendonk, C, Kretz, O, Gass, P, Anlag, K, Orban, PC, Bock, R, Klein, R, und Schütz, G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature genetics*, 23(1):99–103, 1999. PMID: 10471508.
- Tuteja, G und Kaestner, KH. Forkhead transcription factors II. *Cell*, 131(1):192, 2007a. PMID: 17923097.
- Tuteja, G und Kaestner, KH. SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell*, 130(6):1160, 2007b. PMID: 17889656.
- van Bokhoven, H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annual review of genetics*, 45:81–104, 2011. PMID: 21910631.
- van der Horst, A, de Vries-Smits, AMM, Brenkman, AB, van Triest, MH, van den Broek, N, Colland, F, Maurice, MM, und Burgering, BMT. FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nature cell biology*, 8(10):1064–1073, 2006. PMID: 16964248.
- Vaquerizas, JM, Kummerfeld, SK, Teichmann, SA, und Luscombe, NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nature reviews. Genetics*, 10(4):252–263, 2009. PMID: 19274049.
- Venter, JC, Adams, MD, Myers, EW, Li, PW, Mural, RJ, Sutton, GG, Smith, HO, Yandell, M, Evans, CA, Holt, RA, Gocayne, JD, Amanatides, P, Ballew, RM, Huson, DH, Wortman, JR, Zhang, Q, Kodira, CD, Zheng, XH, Chen, L, Skupski, M, Subramanian, G, Thomas, PD, Zhang, J, Gabor Miklos, GL, Nelson, C, Broder, S, Clark, AG, Nadeau, J, McKusick, VA, Zinder, N, Levine, AJ, Roberts, RJ, Simon, M, Slayman, C, Hunkapiller, M, Bolanos, R, Delcher, A, Dew, I, Fasulo, D, Flanigan, M, Florea, L, Halpern, A, Hannenhalli, S, Kravitz, S, Levy, S, Mobarry, C, Reinert, K, Remington, K, Abu-Threideh, J, Beasley, E, Biddick, K, Bonazzi, V, Brandon, R, Cargill, M, Chandramouliswaran, I, Charlab, R, Chaturvedi, K, Deng, Z, Di Francesco, V, Dunn, P, Eilbeck, K, Evangelista, C, Gabrielian, AE, Gan, W, Ge, W, Gong, F, Gu, Z, Guan, P, Heiman, TJ, Higgins, ME, Ji, RR, Ke, Z, Ketchum, KA, Lai, Z, Lei, Y, Li, Z, Li, J, Liang, Y, Lin, X, Lu, F, Merkulov, GV, Milshina, N, Moore, HM, Naik, AK, Narayan, VA, Neelam, B, Nusskern, D, Rusch, DB, Salzberg, S, Shao, W, Shue, B, Sun, J, Wang, Z, Wang, A, Wang, X, Wang, J, Wei, M, Wides, R, Xiao, C, Yan, C, Yao, A, Ye, J, Zhan, M, Zhang, W, Zhang, H, Zhao, Q, Zheng, L, Zhong, F, Zhong, W, Zhu, S, Zhao, S, Gilbert, D, Baumhueter, S, Spier, G, Carter, C, Cravchik, A, Woodage, T, Ali, F, An, H, Awe, A, Baldwin, D, Baden, H, Barnstead, M, Barrow, I, Beeson, K, Busam, D, Carver, A, Center, A, Cheng, ML, Curry, L, Danaher, S, Davenport, L, Desilets, R, Dietz, S, Dodson, K, Doup, L, Ferreira, S, Garg, N, Gluecksmann, A, Hart, B, Haynes, J, Haynes, C, Heiner, C, Hladun, S, Hostin, D, Houck, J, Howland, T, Ibegwam, C, Johnson, J, Kalush, F, Kline, L, Koduru, S, Love, A, Mann, F, May, D, McCawley, S, McIntosh, T, McMullen, I, Moy, M, Moy, L, Murphy, B, Nelson, K, Pfannkoch, C, Pratt, E, Puri, V, Qureshi, H, Reardon, M, Rodriguez, R, Rogers, YH, Romblad, D, Ruhfel, B, Scott, R, Sitter, C, Smallwood, M, Stewart, E, Strong, R, Suh, E, Thomas, R, Tint, NN, Tse, S, Vech, C, Wang, G, Wetter, J, Williams, S, Williams, M, Windsor, S, Winn-Deen, E, Wolfe, K, Zaveri, J, Zaveri, K, Abril, JF, Guigó, R, Campbell, MJ, Sjolander, KV, Karlak, B, Kejariwal, A, Mi, H, Lazareva, B, Hatton, T, Narechania, A, Diemer, K, Muruganujan, A, Guo, N, Sato, S, Bafna, V, Istrail, S, Lippert, R, Schwartz, R, Walenz, B, Yooshef, S, Allen, D, Basu, A, Baxendale, J, Blick, L, Caminha, M, Carnes-Stine, J, Caulk, P, Chiang, YH, Coyne, M, Dahlke, C, Mays, A, Dombroski, M, Donnelly, M, Ely, D, Esparham, S, Fosler, C, Gire, H, Glanowski, S, Glasser, K, Glodek, A, Gorokhov, M, Graham, K, Gropman, B, Harris, M, Heil, J, Henderson,

- S, Hoover, J, Jennings, D, Jordan, C, Jordan, J, Kasha, J, Kagan, L, Kraft, C, Levitsky, A, Lewis, M, Liu, X, Lopez, J, Ma, D, Majoros, W, McDaniel, J, Murphy, S, Newman, M, Nguyen, T, Nguyen, N, Nodell, M, Pan, S, Peck, J, Peterson, M, Rowe, W, Sanders, R, Scott, J, Simpson, M, Smith, T, Sprague, A, Stockwell, T, Turner, R, Venter, E, Wang, M, Wen, M, Wu, D, Wu, M, Xia, A, Zandieh, A, und Zhu, X. The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507):1304–1351, 2001. PMID: 11181995.
- Vernes, SC, Newbury, DF, Abrahams, BS, Winchester, L, Nicod, J, Groszer, M, Alarcón, M, Oliver, PL, Davies, KE, Geschwind, DH, Monaco, AP, und Fisher, SE. A functional genetic link between distinct developmental language disorders. *The New England journal of medicine*, 359(22):2337–2345, 2008. PMID: 18987363.
- Vernes, SC, Oliver, PL, Spiteri, E, Lockstone, HE, Puliyadi, R, Taylor, JM, Ho, J, Mombereau, C, Brewer, A, Lowy, E, Nicod, J, Groszer, M, Baban, D, Sahgal, N, Cazier, JB, Ragoussis, J, Davies, KE, Geschwind, DH, und Fisher, SE. Foxp2 regulates gene networks implicated in neurite outgrowth in the developing brain. *PLoS genetics*, 7(7):e1002145, 2011. PMID: 21765815.
- Vincent, AK, Noor, A, Janson, A, Minassian, BA, Ayub, M, Vincent, JB, und Morel, CF. Identification of genomic deletions spanning the PCDH19 gene in two unrelated girls with intellectual disability and seizures. *Clinical genetics*, 82(6):540–545, 2012. PMID: 22091964.
- Visel, A, Blow, MJ, Li, Z, Zhang, T, Akiyama, JA, Holt, A, Plajzer-Frick, I, Shoukry, M, Wright, C, Chen, F, Afzal, V, Ren, B, Rubin, EM, und Pennacchio, LA. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature*, 457(7231):854–858, 2009. PMID: 19212405.
- Wang, B, Lin, D, Li, C, und Tucker, P. Multiple domains define the expression and regulatory properties of foxp1 forkhead transcriptional repressors. *The Journal of biological chemistry*, 278(27):24259–24268, 2003. PMID: 12692134.
- Wang, B, Weidenfeld, J, Lu, MM, Maika, S, Kuziel, WA, Morrissey, EE, und Tucker, PW. Foxp1 regulates cardiac outflow tract, endocardial cushion morphogenesis and myocyte proliferation and maturation. *Development (Cambridge, England)*, 131(18):4477–4487, 2004. PMID: 15342473.
- Waterhouse, PM, Wang, MB, und Lough, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 411(6839):834–842, 2001. PMID: 11459066.
- Wederell, ED, Bilenky, M, Cullum, R, Thiessen, N, Dagpinar, M, Delaney, A, Varhol, R, Zhao, Y, Zeng, T, Bernier, B, Ingham, M, Hirst, M, Robertson, G, Marra, MA, Jones, S, und Hoodless, PA. Global analysis of in vivo foxa2-binding sites in mouse adult liver using massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Research*, 36(14):4549–4564, 2008. PMID: 18611952 PMCID: PMC2504304.
- Weigel, D und Jäckle, H. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell*, 63(3):455–456, 1990. PMID: 2225060.
- Whiting, P und Lindstrom, J. Purification and characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(2):595–599, 1987. PMID: 3467376.
- Wildin, RS, Ramsdell, F, Peake, J, Faravelli, F, Casanova, JL, Buist, N, Levy-Lahad, E, Mazzella, M, Goulet, O, Perroni, L, Bricarelli, FD, Byrne, G, McEuen, M, Proll, S, Appleby, M, und Brunkow, ME. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics*, 27(1):18–20, 2001. PMID: 11137992.

- Willcutt, EG, Pennington, BF, Olson, RK, Chhabildas, N, und Hulslander, J. Neuropsychological analyses of comorbidity between reading disability and attention deficit hyperactivity disorder: in search of the common deficit. *Developmental neuropsychology*, 27(1):35–78, 2005. PMID: 15737942.
- Wu, Y, Borde, M, Heissmeyer, V, Feuerer, M, Lapan, AD, Stroud, JC, Bates, DL, Guo, L, Han, A, Ziegler, SF, Mathis, D, Benoist, C, Chen, L, und Rao, A. FOXP3 controls regulatory t cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126(2):375–387, 2006. PMID: 16873067.
- Yagi, T und Takeichi, M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & development*, 14(10):1169–1180, 2000. PMID: 10817752.
- Yamagata, K, Andreasson, KI, Sugiura, H, Maru, E, Dominique, M, Irie, Y, Miki, N, Hayashi, Y, Yoshioka, M, Kaneko, K, Kato, H, und Worley, PF. Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *The Journal of biological chemistry*, 274(27):19473–11979, 1999. PMID: 10383464.
- Yang, Y, Hou, H, Haller, EM, Nicosia, SV, und Bai, W. Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation. *The EMBO journal*, 24(5):1021–1032, 2005. PMID: 15692560.
- Zanke, BW, Greenwood, CMT, Rangrej, J, Kustra, R, Tenesa, A, Farrington, SM, Prendergast, J, Olschwang, S, Chiang, T, Crowdy, E, Ferretti, V, Laflamme, P, Sundararajan, S, Roumy, S, Olivier, JF, Robidoux, F, Sladek, R, Montpetit, A, Campbell, P, Bezieau, S, O'Shea, AM, Zogopoulos, G, Cotterchio, M, Newcomb, P, McLaughlin, J, Youngusband, B, Green, R, Green, J, Porteous, MEM, Campbell, H, Blanche, H, Sahbatou, M, Tubacher, E, Bonaiti-Pellié, C, Buecher, B, Riboli, E, Kury, S, Chanock, SJ, Potter, J, Thomas, G, Gallinger, S, Hudson, TJ, und Dunlop, MG. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nature genetics*, 39(8):989–994, 2007. PMID: 17618283.
- Zeesman, S, Nowaczyk, MJM, Teshima, I, Roberts, W, Cardy, JO, Brian, J, Senman, L, Feuk, L, Osborne, LR, und Scherer, SW. Speech and language impairment and oromotor dyspraxia due to deletion of 7q31 that involves FOXP2. *American journal of medical genetics. Part A*, 140(5):509–514, 2006. PMID: 16470794.
- Zhao, H und Dean, A. Organizing the genome: enhancers and insulators. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 83(4):516–524, 2005. PMID: 16094455.
- Zheng, Y, Josefowicz, SZ, Kas, A, Chu, TT, Gavin, MA, und Rudensky, AY. Genome-wide analysis of foxp3 target genes in developing and mature regulatory t cells. *Nature*, 445(7130):936–940, 2007. PMID: 17237761.
- Zilina, O, Reimand, T, Zjablovskaja, P, Männik, K, Männamaa, M, Traat, A, Puusepp-Benazzouz, H, Kurg, A, und Ounap, K. Maternally and paternally inherited deletion of 7q31 involving the FOXP2 gene in two families. *American journal of medical genetics. Part A*, 158A(1):254–256, 2012. PMID: 22105961.

Anhang

5.3.1 ISH auf murinen Gehirnschnitten mit *Foxp1* und *Pcdh17* sense- und antisense-RNA-Sonden

Abbildung 5.5 zeigt ISH auf E15 wt-Gehirnschnitten mit *Foxp1* und *Pcdh17* sense- und antisense-RNA-Sonden. Die sense-RNA-Sonden dienten als Negativkontrolle. Durchgeführte ISH mit den sense-RNA-Sonden führten zu keiner Färbung der Gehirnschnitte.

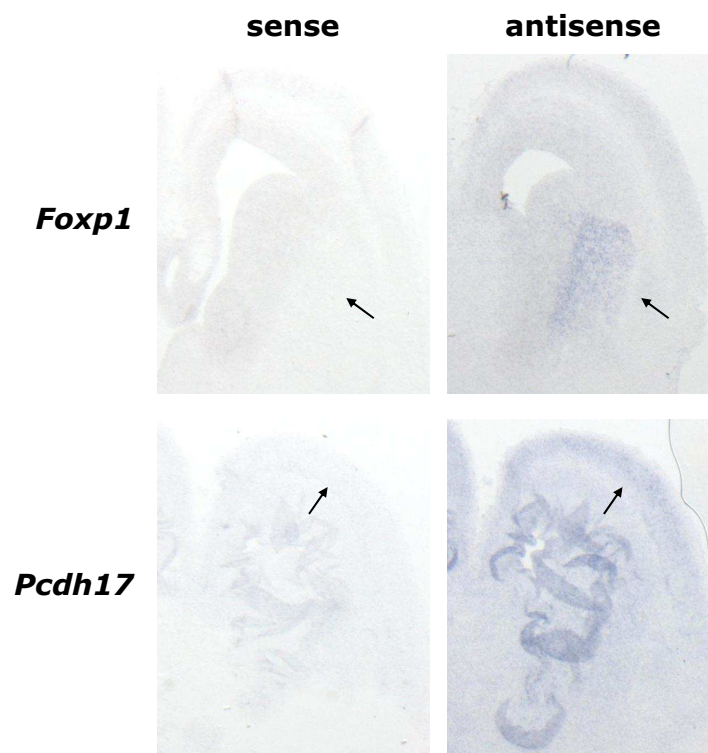


Abbildung 5.5: ISH auf murinen Gehirnschnitten mit *Foxp1* und *Pcdh17* sense- und antisense-RNA-Sonden.

Foxp1 und *Pcdh17* sense-RNA-Sonden zeigen keine Färbungen auf den wt-Gehirnschnitten des Entwicklungstages E15. Die *Foxp1* antisense-RNA-Sonde macht die Expression des Gens im Striatum (siehe Pfeil) sichtbar. Die Expression von *Pcdh17* im Cortex (siehe Pfeil) wird durch die *PCDH17* antisense-RNA-Sonde gezeigt.

5.3.2 Heatmaps biologischer Prozesse, an denen *Chrna4* beteiligt ist

Die folgenden Abbildungen zeigen Heatmaps, welche die Expression der Gene in biologischen Prozessen darstellen, die in den Gehirnen der KO-Embryonen der *Foxp1*^{-/-}-Mauslinie um mindestens 10 % hochreguliert waren (Ergebnis-Teil 4.2.8).

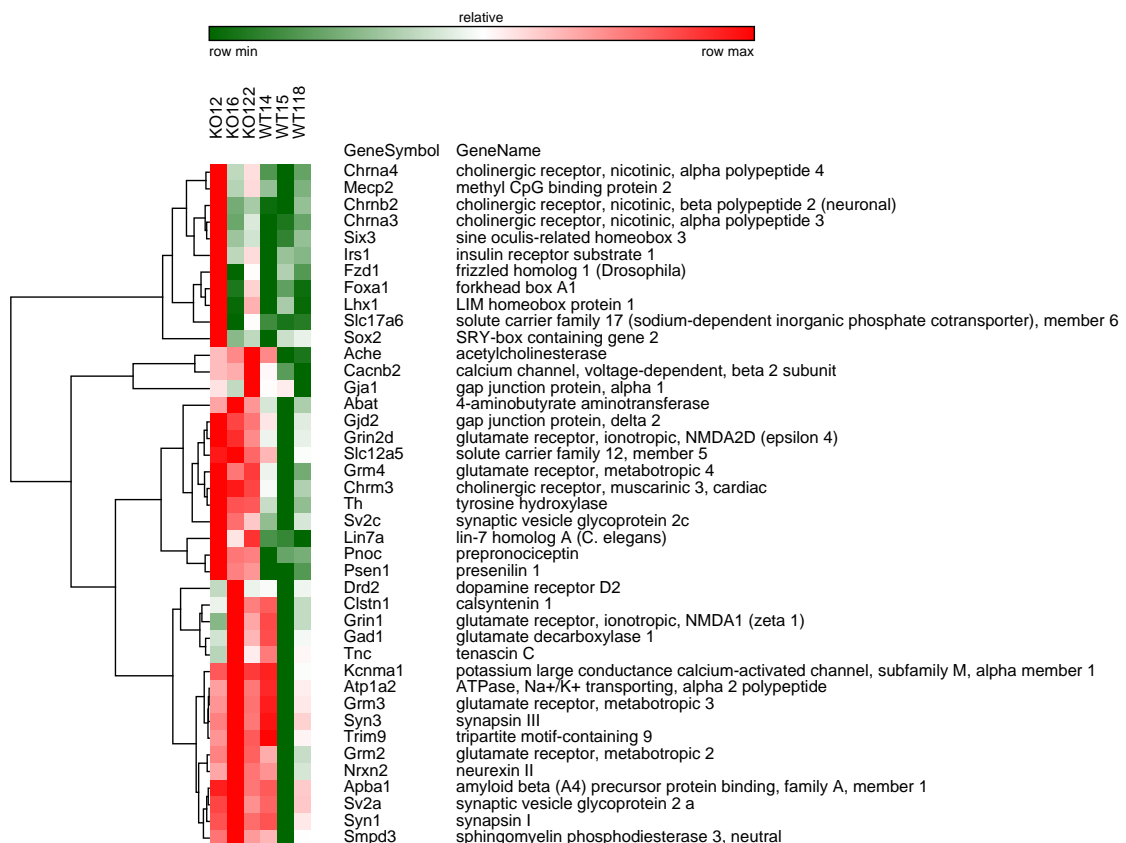


Abbildung 5.6: Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Zellkommunikation“.

Gegenüberstellung der Expression in Vorderhirnen von drei *Foxp1*^{-/-}-Embryonen und drei wt-Embryonen (KO12, KO122, KO16, wt14, wt15 und wt 118) am Entwicklungstag E16. Alle aufgelisteten Gene waren in den *Foxp1*^{-/-}-Embryonen um mindestens 10 % hochreguliert (FDR<0,05). Rot: erhöhte Expression; grün: Expression entspricht der wt-Expression.

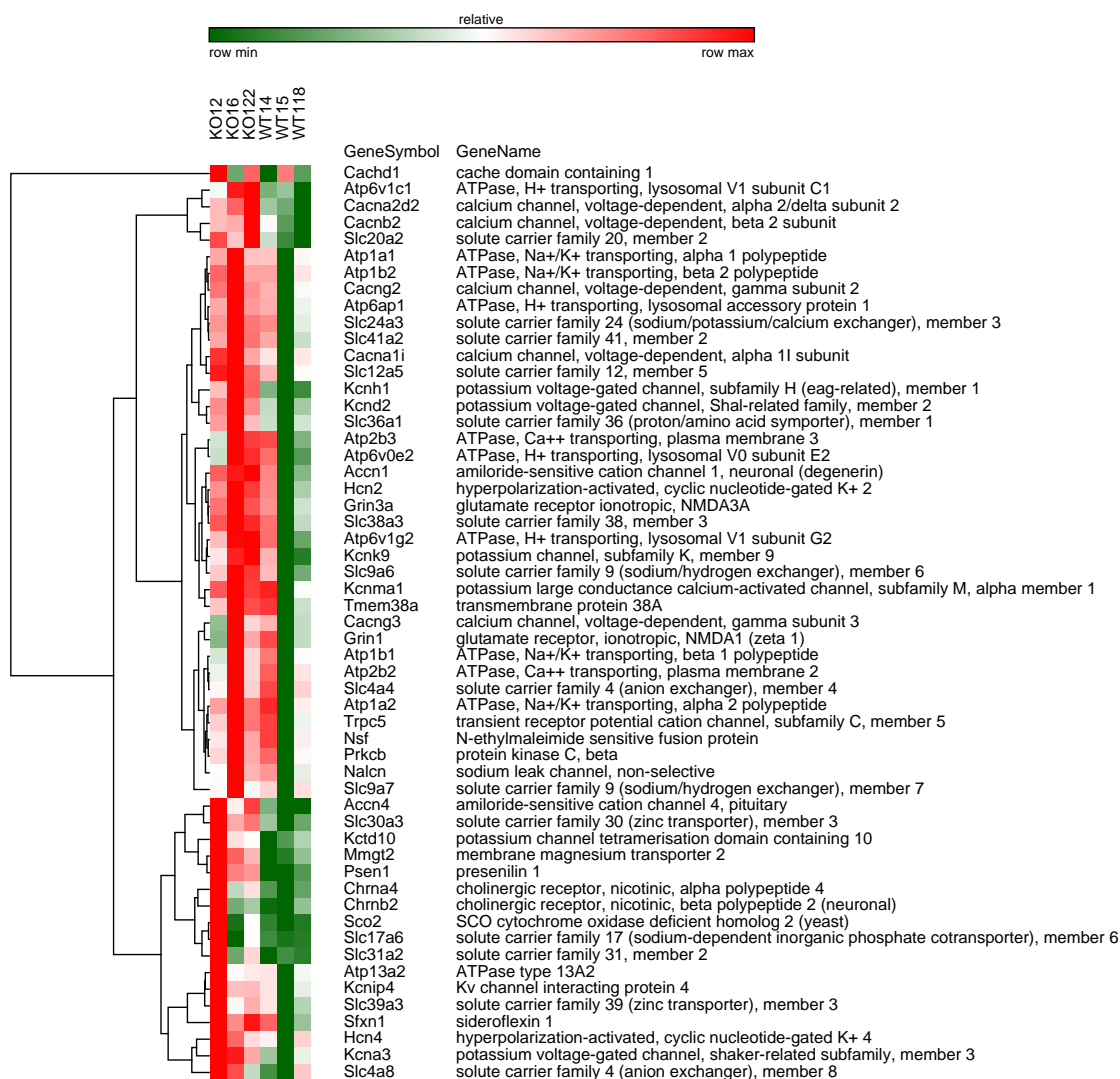


Abbildung 5.7: Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Kationentransport“.

Gegenüberstellung der Expression in Vorderhirnen von drei *Foxp1*^{-/-}-Embryonen und drei wt-Embryonen (KO12, KO122, KO16, wt14, wt15 und wt 118) am Entwicklungstag E16. Alle aufgelisteten Gene waren in den *Foxp1*^{-/-}-Embryonen um mindestens 10 % hochreguliert (FDR<0,05). Rot: erhöhte Expression; grün: Expression entspricht der wt-Expression.

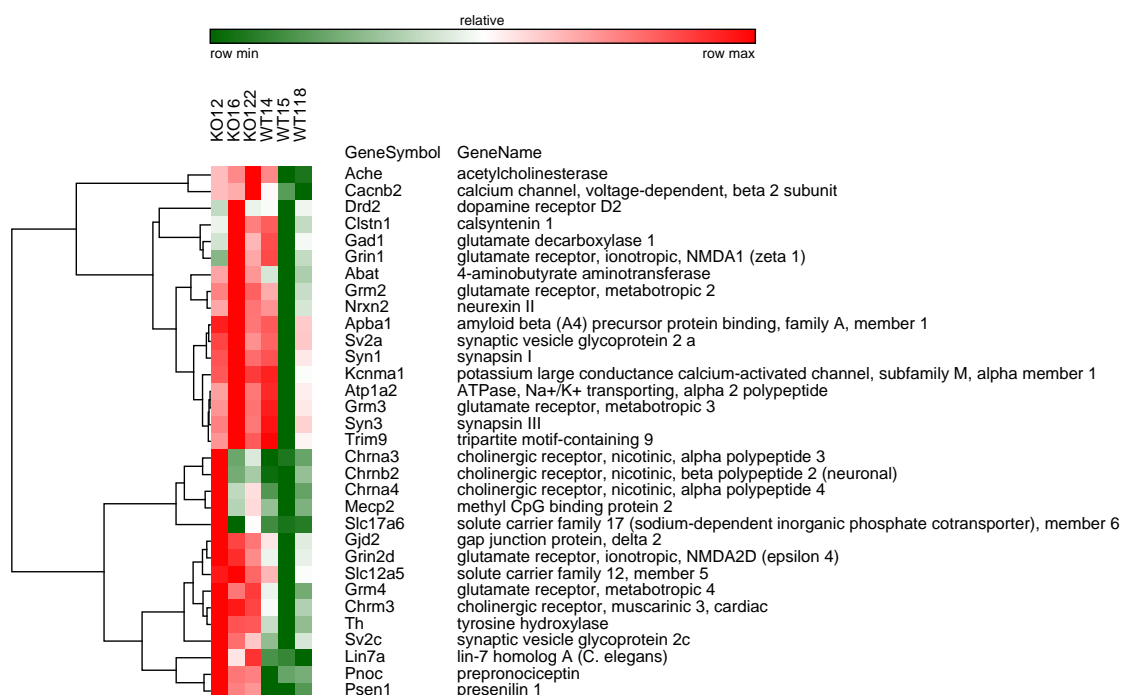


Abbildung 5.8: Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Synaptische Transmission“. Gegenüberstellung der Expression in Vorderhirnen von drei *Foxp1*^{-/-}-Embryonen und drei wt-Embryonen (KO12, KO122, KO16, wt14, wt15 und wt 118) am Entwicklungstag E16. Alle aufgelisteten Gene waren in den *Foxp1*^{-/-}-Embryonen um mindestens 10 % hochreguliert (FDR<0,05). Rot: erhöhte Expression; grün: Expression entspricht der wt-Expression.

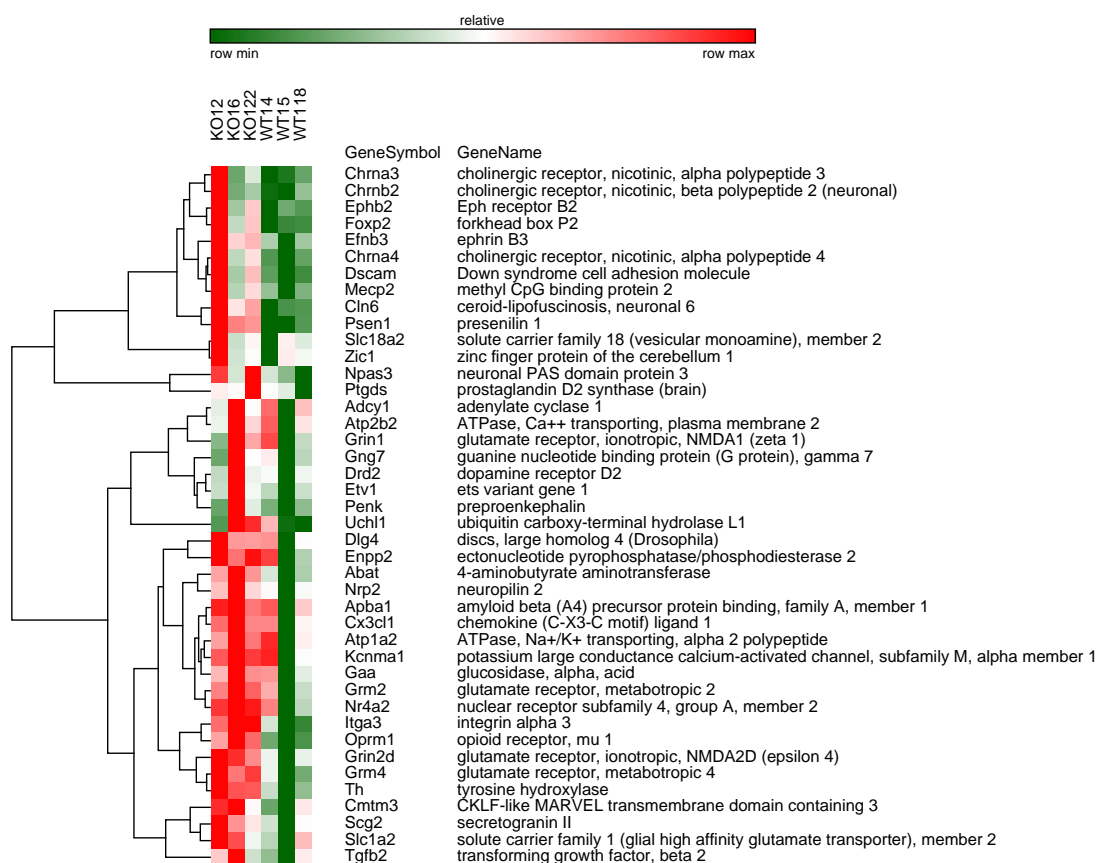


Abbildung 5.9: Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Verhalten“.

Gegenüberstellung der Expression in Vorderhirnen von drei *Foxp1*^{-/-}-Embryonen und drei wt-Embryonen (KO12, KO122, KO16, wt14, wt15 und wt 118) am Entwicklungstag E16. Alle aufgelisteten Gene waren in den *Foxp1*^{-/-}-Embryonen um mindestens 10 % hochreguliert (FDR<0,05). Rot: erhöhte Expression; grün: Expression entspricht der wt-Expression.

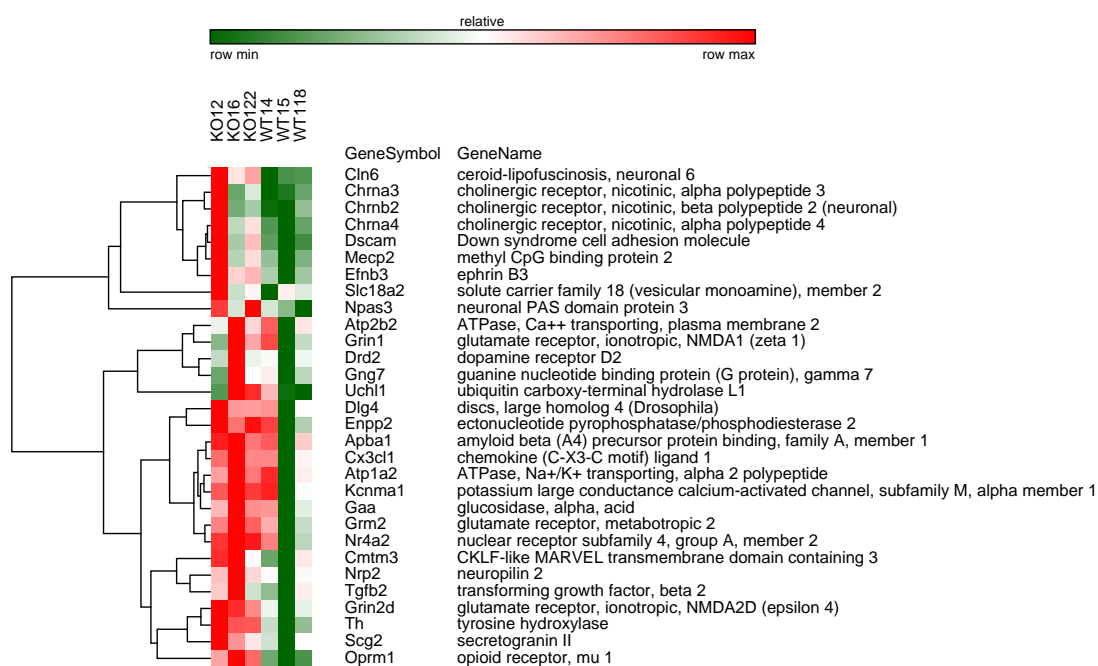


Abbildung 5.10: Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Motorisches Verhalten“. Gegenüberstellung der Expression in Vorderhirnen von drei *Foxp1*^{-/-}-Embryonen und drei wt-Embryonen (KO12, KO122, KO16, wt14, wt15 und wt 118) am Entwicklungstag E16. Alle aufgelisteten Gene waren in den *Foxp1*^{-/-}-Embryonen um mindestens 10 % hochreguliert (FDR<0,05). Rot: erhöhte Expression; grün: Expression entspricht der wt-Expression.

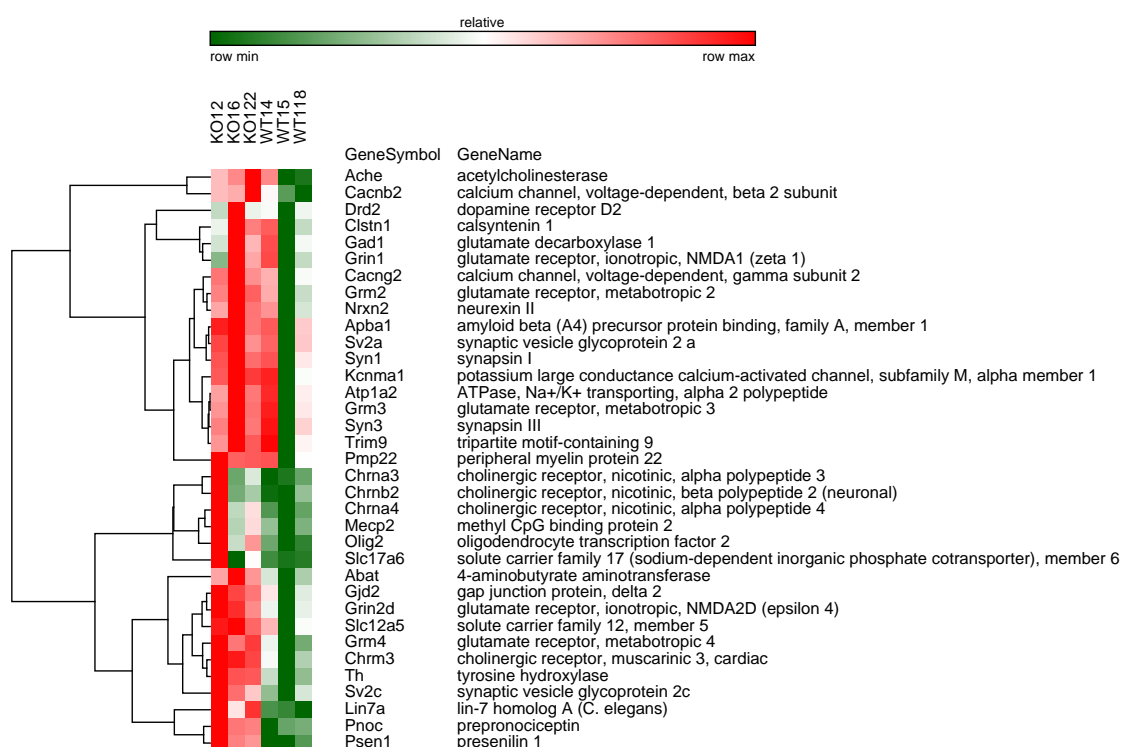


Abbildung 5.11: Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Transmission von Nervenimpulsen“.

Gegenüberstellung der Expression in Vorderhirnen von drei *Foxp1*^{-/-}-Embryonen und drei wt-Embryonen (KO12, KO122, KO16, wt14, wt15 und wt 118) am Entwicklungstag E16. Alle aufgelisteten Gene waren in den *Foxp1*^{-/-}-Embryonen um mindestens 10 % hochreguliert (FDR<0,05). Rot: erhöhte Expression; grün: Expression entspricht der wt-Expression.

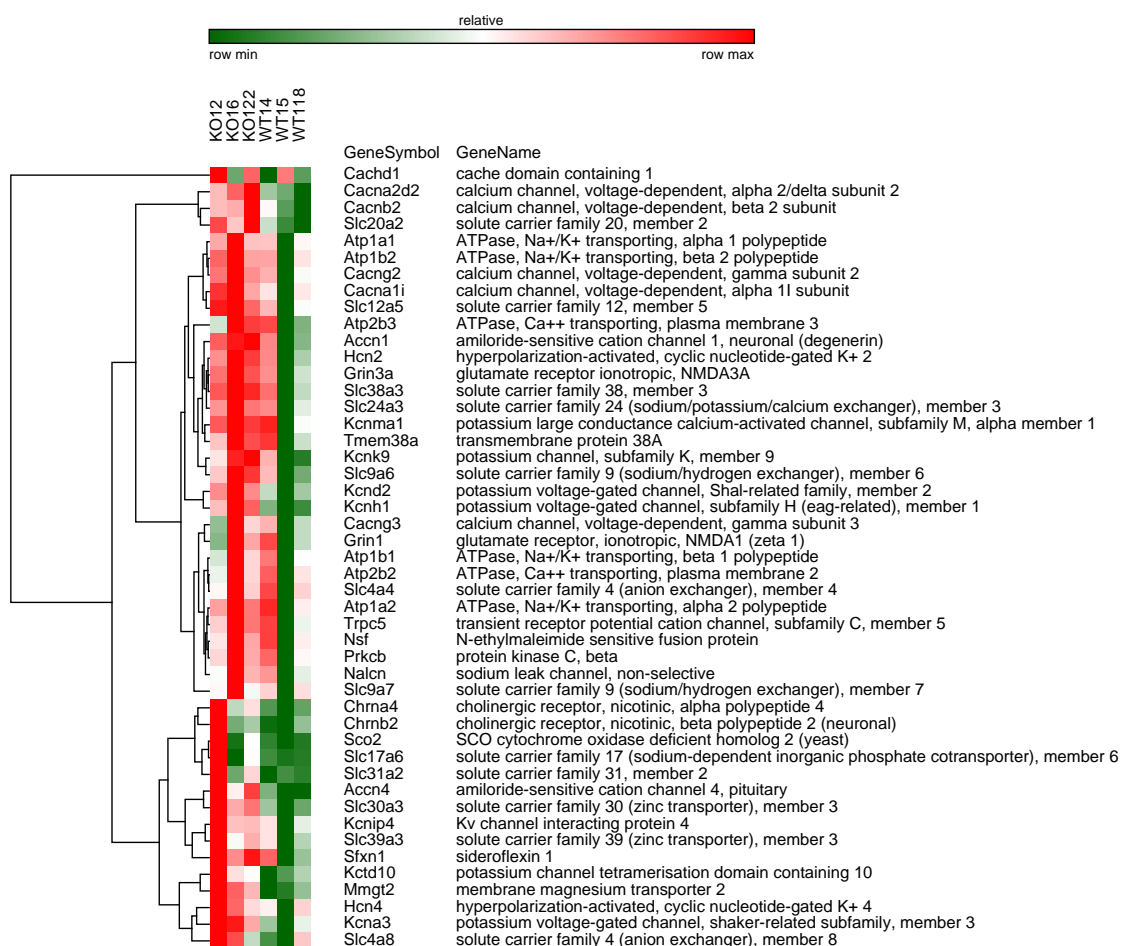


Abbildung 5.12: Heatmap-Darstellung des biologischen Prozesses „Metallionen“.

Gegenüberstellung der Expression in Vorderhirnen von drei *Foxp1*^{-/-}-Embryonen und drei wt-Embryonen (KO12, KO16, KO122, wt14, wt15 und wt 118) am Entwicklungstag E16. Alle aufgelisteten Gene waren in den *Foxp1*^{-/-}-Embryonen um mindestens 10 % hochreguliert (FDR<0,05). Rot: erhöhte Expression; grün: Expression entspricht der wt-Expression.