

## FoxP2 透過 PDGF 訊息傳導路徑調控 P19 細胞的神經元分化

李明洋 李明軒 王慈蔚\*

國立臺灣師範大學生命科學系

(收稿日期: 2010.5.2, 接受日期: 2011.5.11)

### 摘 要

FoxP2 是第一個被發現與人類語言能力有關的基因, 此基因在脊椎動物中有高度保守性。在成年鳴禽中, 前腦的側腦室區新生成的神經前驅細胞會移動到與學習唱歌有關的區域 Area X, 並在這區域分化成神經元。側腦室區的神經前驅細胞及 Area X 的新生神經元都有 FoxP2 的表現, 這暗示著 FoxP2 可能會調控神經元新生, 但其機制仍未明瞭。前人研究發現 Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) 可能是 FoxP2 的下游基因。PDGF 會促進小鼠側腦室下區的神經幹細胞增生, 並產生新的寡樹突細胞。因此我們假設 FoxP2 可能是透過 PDGFR $\alpha$  來調控神經元新生。我們的實驗結果顯示 FoxP2 會抑制 P19 細胞的神經元分化, 且此現象可被 PDGFR $\alpha$  抑制劑所反轉。此結果顯示 FoxP2 會透過 PDGFR $\alpha$  來調控神經元分化。

**關鍵詞:** 神經發育、神經元新生、轉錄因子

### 緒 言

神經元新生(neurogenesis)是近十幾年來深受科學家討論的議題, 因為一般相信哺乳類的神經系統在胚胎期與生長期就已發展完全, 並且在成年後神經元不會再新生、分化, 只會逐漸死亡(Doetsch and Hen, 2005)。近年來由於生物技術的進展, 科學家發現在成年老鼠的海馬迴中有新的神經元生成(Ming and Song, 2005)。成年神經元新生的現象同樣也在其他物種被發現, 像是金絲雀、絨猴以及人類等溫血脊椎動物(Eriksson *et al.*, 1998; Kempermann *et al.*, 1997; Rakic, 2002; Bakan *et al.*, 2007), 且只有特定的腦區會發生成年神經元新生。這些新生成的神經母細胞(neural progenitor cell, NPC)會遷徙到特定位置並分化成特定神經細胞。以小鼠為例, 側腦室下區(subventricular zone, SVZ)和海馬迴(hippocampus)中的齒狀迴顆粒細胞下區(subgranular zone, SGZ)都有神經幹細胞的存在(Doetsch and Hen, 2005; Ming and Song, 2005)。在 SVZ, 神經幹細胞所分化出來的神經母細胞會不斷增生, 藉由 rostral migratory stream 這條路徑遷徙到嗅球, 並在嗅球分化成 interneuron (Imayoshi *et al.*, 2008; Lois and Alvarez-Buylla, 1004), 負責嗅覺辨識的功能(Enwere *et al.*, 2004; Rochefort *et al.*, 2002)。在 SGZ 所分化的神經母細胞也會不斷遷徙到較外

層齒狀迴(dentate gyrus), 分化成顆粒細胞(granule cells), 與學習和空間記憶有關(Meshi *et al.*, 2006; Shors *et al.*, 2001)。在一些鳴禽如金絲雀, 前腦的側腦室區(ventricular zone, VZ)新生成的神經母細胞會移動到與唱歌有關的區域, 如 HVC、Area X, 並在這些區域分化成神經元(Nottebohm, 2004; Paton and Nottebohm, 1984)。

FoxP2 (Forkhead box protein P2)是一種屬於 Fox family 的轉錄因子, 因其有一個 Forkhead box DNA 結合區而得名。FoxP2 基因是一個與人類語言能力有關的基因(Lai *et al.*, 2001; Feuk *et al.*, 2006; Lennon *et al.*, 2007; MacDermot *et al.*, 2005; Zeeman *et al.*, 2006; Shriberg *et al.*, 2006)。最早是藉由研究 KE 家族, 發現這個家族連續三代, 有近乎半數的家族成員有遺傳性語言方面的障礙。透過更進一步的研究, 得知這些成員的第七對染色體上的 FoxP2 基因都有發生突變, 於是 FoxP2 便成為第一個被發現與人類語言能力有關的基因(Fisher *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2000; Hurst *et al.*, 1990)。FoxP2 是一個高度保守性的基因, 在許多的物種如小鼠、鳴禽、蝙蝠等都有表現(Haesler *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Teramitsu *et al.*, 2004; Ferland *et al.*, 2003; Haesler *et al.*, 2004; White *et al.*, 2006)。以小鼠為例, 剔除 FoxP2 基因同型合子的小鼠在出生後, 就會死亡; 異型合子的小鼠會失去能夠呼喚母鼠的超聲波能力(Shu

\*通信作者: 王慈蔚 (Tsu-Wei Wang); FAX: 886-2-29312904; E-mail: twwang@ntnu.edu.tw

*et al.*, 2005)。斑胸草雀(Zebra finch)雄性幼鳥在學習唱歌的時期(sensorimotor period)，一個負責學習唱歌的神經核 Area X 的 FoxP2 的表現量會上升，而學會唱歌後 FoxP2 的表現量又會恢復平常。若以 RNAi 的方法降低 Area X 的 FoxP2 的表現量，會發現這樣的幼鳥無法學會該物種鳴叫的旋律，藉此也可以知道 FoxP2 對斑胸草雀學習唱歌是必要的(Haesler *et al.*, 2007; Rochefort *et al.*, 2007)。有趣的是，此研究也發現 FoxP2 會影響 Area X 內神經元纖維的密度，暗示著 FoxP2 影響語言功能可能與神經發育有關。

鳴禽模式中，前腦的 VZ 新生成的神經母細胞會移動到與學習唱歌有關的區域 Area X，並在這區域分化成神經元(Nottebohm, 2004; Paton and Nottebohm, 1984)。由於在 VZ 及 Area X 都有 FoxP2 的表現 (Rochefort *et al.*, 2007)，這暗示著 FoxP2 可能會調控神經元新生。先前在人類的研究指出 FoxP2 的下游基因有可能是 Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ )(Konopka *et al.*, 2009)。PDGFR 是一種位於細胞膜上的 receptor tyrosine kinase (RTK)，會受到 PDGF 的活化。PDGF family 包含了 PDGF-A、B、C、D 四種單體類型，四種單體又可兩兩形成有功能的 homodimer 及 heterodimer：PDGF-AA、-AB、-BB、-CC、-DD。其受器 PDGFR 也有兩種單體 PDGFR- $\alpha$ 、 $\beta$ ，同樣也是聚合成 dimer：PDGFR- $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$  and  $-\alpha\beta$  才有功能。PDGFR- $\beta\beta$  會受到 PDGF-BB、-DD 的活化，PDGFR- $\alpha\beta$  會受到 PDGF-AB、-BB、-CC。其中 PDGFR- $\alpha\alpha$  則會受除了 PDGF-DD 外，其他所有類型 PDGF 的活化(Shim *et al.*, 2010; Williams, 1989; Heldin *et al.*, 1989; Heldin *et al.*, 1992)。目前已知 PDGFR 調控細胞的生長、分裂增生以及胚胎發育，包括血管新生(angiogenesis)、結締組織的纖維母細胞(fibroblast)分裂、寡樹突前驅細胞(oligodendrocyte precursor)的增生，以及神經元新生(Xie *et al.*, 2001; Tsutsumi *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2006; Takakura *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2009; Cameron *et al.*, 1998; Erlandsson *et al.*, 2001)。在小鼠模式中，SVZ 內的 NSC 會表現 PDGFR $\alpha$ ，而且這些 NSC 會產生新的神經元以及寡樹突細胞。PDGF 會刺激 NSC 的增生(Jackson *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 1998; Erlandsson *et al.*, 2001)。因此我們推測 FoxP2 可能是透過 PDGFR $\alpha$  進而影響神經元新生。透過小鼠胚胎瘤細胞 P19 的研究，我們發現 FoxP2 會抑制 P19 細胞的神經

元分化，且 PDGFR $\alpha$  的抑制劑會反轉此現象。這代表 PDGFR $\alpha$  在神經發育上有可能是 FoxP2 的下游媒介。

## 材料與方法

### P19 細胞株培養

小鼠胚胎腫瘤細胞 P19，以 MEM $\alpha$  加上 10% 小牛及胎牛血清和 10% Penn/Strep，在 37°C 含有 5% CO<sub>2</sub> 的生長箱內培養。實驗時，以每格  $1.2 \times 10^5$  cells 的密度，培養在 12 孔盤中。進行基因轉殖後一天，將轉殖過的 P19 細胞移至有披覆 laminin 的 12 孔盤使其進行分化，兩小時後換培養基。在抑制 PDGFR $\alpha$  實驗方面，則是在培養基中加入 PDGFR $\alpha$  中和抗體(R&D)來達成。實驗方式是在轉殖後進行分化的細胞中，以 1:1000 的濃度加入 PDGFR $\alpha$  中和抗體。

### 細胞基因轉殖

本實驗分為四組：控制組轉殖空質體 (US2; human ubiquitin C promoter) (Yu *et al.*, 2008)，第二組轉殖 Mash1，第三組轉殖 FoxP2，第四組轉殖 Mash1 和 FoxP2。每一組並共轉殖 GFP 來標定轉殖成功的細胞。在轉殖前一小時，將培養基換成不含 Penn/Strep 的 MEM $\alpha$ ，放入 37°C 含有 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱內培養。之後以 Lipofectamine 2000 將質體轉殖到 P19 細胞內。

### 免疫染色

將培養盤中的培養基吸除後，以 1×PBS 浸洗細胞約十秒。再加入 4°C 的 4% paraformaldehyde (PFA) 以固定細胞。15 分鐘再以 PBT 在室溫中清洗 3 次，每次 5 分鐘。之後，將細胞以 blocking buffer 浸置 1 小時，再加入初級抗體 mouse anti-Tuj1 (1:1000; Covance) 於 4°C 浸泡 16~18 小時。之後，以 PBT 浸洗 3 次，每次各 5 分鐘後，加入次級抗體 goat anti-mouse (1:200; Jackson ImmunoResearch) 中 2 小時。最後再以 PBT 在室溫中清洗 3 次，再加入新的 PBT 浸存，並藉由螢光顯微鏡來觀察記錄染色結果。

## 結果

從前人的 FoxP2 目標基因預測研究顯示 FoxP2 可能參與神經發育與神經可塑性(Spiteri *et al.*, 2007; Vernes *et al.*, 2007)。然而，關於 FoxP2

是否調控神經元新生及其機制卻還不明。為此，我們使用小鼠胚胎腫瘤細胞 P19 來當作研究模式。P19 細胞是一種類似幹細胞、具有多重分化能力的細胞。它可透過藥物處理或轉殖 neural basic helix-loop-helix (bHLH)轉錄因子的方式，分化成神經或肌肉細胞(McBurney *et al.*, 1982; Farah *et al.*, 2000)。P19 細胞可再現神經發育的各個階段，也就是從未分化的幹細胞狀態決定細胞命運，脫離細胞週期，最後分化成神經元。基於以上原因，P19 細胞成了神經發育的一個優良體外研究模式。我們以將 P19 細胞轉殖 FoxP2 的方式來探討它在神經發育上扮演的角色。由於前人研究顯示當 P19 細胞轉殖入 bHLH 轉錄因子 Mash1 時會促使它們分化成神經元(Farah *et al.*, 2000)，我們以同樣的實驗當作正向控制組。由於 FoxP2 本身也許不足以促進 P19 細胞分化成神經元，我們也設計一組 Mash1 和 FoxP2 的共轉殖組。空質體組(US2)為控制組。另外，enhanced green fluorescent protein (EGFP) 也會共轉殖進入各組，來標定轉殖成功的細胞。轉殖後的細胞被培養於促進細胞分化的條件中三天，之後以神經元專一蛋白 neuron-specific class III  $\beta$ -tubulin (Tuj1)免疫染色的方式來看神經元分化的情形。當 P19 細胞轉殖入 US2 後，非常少細胞分化成神經元( $2.3 \pm 1.26\%$ ; 圖一 A, E)。如預期，大部分細胞轉殖入 Mash1 後呈現 Tuj1 染色，顯示它們已分化成神經元( $94.74 \pm 4.15\%$ ;  $p < .01$ ; 圖一 B, E)。然而，在 FoxP2 組中大部分轉殖成功的細胞並不表現 Tuj1，代表它們未分化成神經元( $11.2 \pm 5.44\%$ ; 圖一 C, E)。當細胞共轉殖入 Mash1 和 FoxP2，部分細胞表現 Tuj1 ( $69.53 \pm 5.1\%$ )，一部份則不(圖一 D)。有趣的是，當與 Mash1 組比較的時候，共轉殖入 Mash1 和 FoxP2 組的神經元分化顯著較低( $p < .05$ ; 圖一 E)。以上結果指出，FoxP2 本身無法促進 P19 細胞分化成神經元，且它會抑制 Mash1 促進神經元分化的效果。此抑制作用並非源於 FoxP2 減少 Mash1 的表現所致，因為在 FoxP2 與 Mash1 共轉殖組，Mash1 的表現量並不低於 Mash1 單轉殖組(結果未呈現)。

從人類神經細胞瘤的研究顯示 Platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) 可能是 FoxP2 的下游目標基因之一(Konopka *et al.*, 2009)。PDGF 已被報導是一個參與神經系統發育的重要基因。它會影響細胞分裂、神經元分化、保護，以及寡樹突細胞分化(Valenzuela *et al.*, 1997)。因此我們推測 FoxP2 可能是透過下游

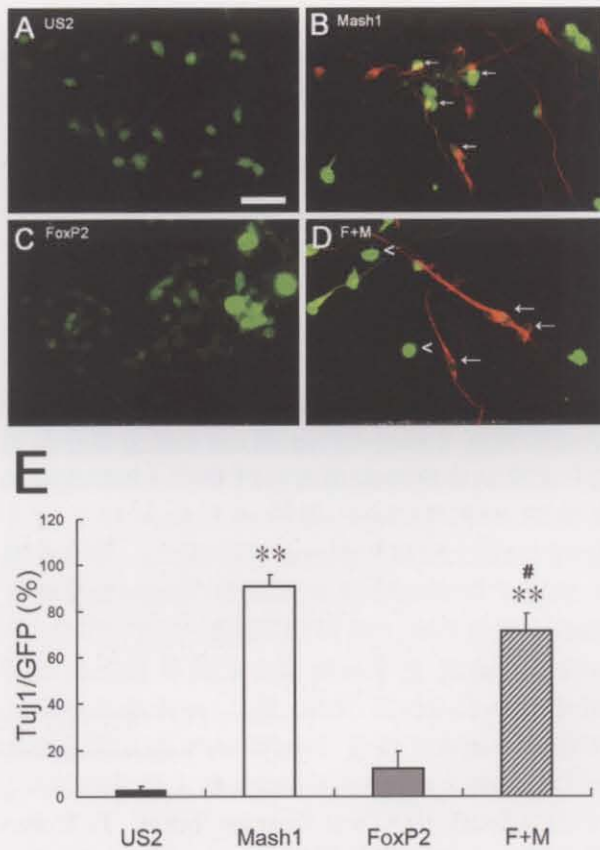
PDGFR $\alpha$  來控制神經元新生。為了測試此假設，在 P19 細胞轉殖入上述各組質體後，我們將其培養於有 PDGFR $\alpha$  中和抗體的分化條件中三天。之後再以 Tuj1 免疫染色的方式來看神經元分化的情形。如果 PDGF 訊息傳導路徑真為 FoxP2 下游，且 FoxP2 不促進神經元分化，那當細胞以 PDGFR $\alpha$  中和抗體來抑制 PDGF 功能時，應能解除 FoxP2 對神經元分化的抑制效果。與上述實驗一樣，轉殖入空質體的控制組細胞不會分化成神經元 (Con/Veh:  $0.32 \pm 0.34\%$ ; Con/Ab:  $0.27 \pm 0.15\%$ )。大部分轉殖入 FoxP2 的細胞也不會 (FoxP2/Veh:  $2.84 \pm 1.05\%$ ; 圖二)。但當這些轉殖過 FoxP2 的細胞培養在含有 PDGFR $\alpha$  中和抗體的條件下，表現 Tuj1 的神經元比例顯著增多 (FoxP2/Ab:  $5.52 \pm 1.19\%$ ;  $p < .05$ ; 圖二)。當共轉殖入 Mash1 和 FoxP2 後，大於 50% 的細胞分化成神經元 (M+F/Veh:  $50.14 \pm 9.08\%$ )，且 PDGFR $\alpha$  中和抗體的處理會增加細胞分化成神經元的趨勢 (M+F/Ab:  $66.21 \pm 12.56\%$ ; 圖二)。此結果顯示，PDGFR $\alpha$  的確可能是 FoxP2 的下游目標基因之一。

## 討 論

本研究顯示，一個與神經可塑性和語言相關的轉錄因子 FoxP2 會透過下游 PDGF 的訊息傳導路徑，來抑制 P19 細胞分化成神經元。因此，我們的研究提供 FoxP2 參與神經系統發育的重要證據。

P19 細胞雖然不是神經幹細胞，但它具備許多正常神經系統發育的特徵。由於它可快速在實驗室建立培養模式，且可透過藥物或基因轉殖的方式分化成神經細胞，讓它成為研究 FoxP2 與神經發育的第一步。為了探討 FoxP2 與神經發育的關係，我們可以繼續以培養胚胎神經前驅細胞和出生後神經幹細胞的方式，或是直接以動物模式來研究(Reynolds and Weiss, 1992; Gritti *et al.*, 1996; Seaberg and van der Kooy, 2002)。FoxP2 在發育時期的前腦，主要表現在紋狀體 (striatum) 的神經元裡，且 FoxP2 會促進紋狀體神經元纖維的密度。這顯示在不同細胞以及不同發育時期表現 FoxP2，可能會有不同的結果。

從本研究發現 FoxP2 會抑制 Mash1 促進神經元分化的能力，代表這兩個轉錄因子有交互作用關係。其可能機制包括：FoxP2 會抑制 Mash1 的表現；FoxP2 會抑制 Mash1 結合到其 DNA 調控序列



圖一、FoxP2不促進P19細胞分化成神經元。為了探討FoxP2是否影響神經元分化，P19細胞分別轉殖US2、Mash1、FoxP2或Mash1加上FoxP2，每一組別並共轉殖GFP來標定轉殖成功細胞。培養三天後，以神經元專一蛋白Tuj1免疫染色(紅色)的方式來看細胞分化成神經元的情形。當細胞轉殖入空質體US2後，幾乎沒有細胞分化成神經元(A, E)。轉殖入Mash1則可讓大多數的細胞分化成神經元(B, E; 箭號所指)。大多數轉殖入FoxP2的細胞並不會分化成神經元(C, E)。在共轉殖入Mash1和FoxP2的細胞當中，部分分化成神經元(D, E; 箭號所指)，部分則不(D; 箭頭所指)。E圖為轉殖成功(表現GFP)的細胞分化成神經元(同時表現GFP和Tuj1)的比例，以平均加減標準誤呈現。\*\*表示 $p$ 小於0.01；#表示 $p$ 小於0.05。\*是與控制組相比；#是與Mash1組比較。比例尺：50 微米。

**Figure 1.** To test the effect of FoxP2 on neuronal differentiation, P19 cells were transfected with control (US2), Mash1, FoxP2 or Mash1 plus FoxP2 (M+F) along with EGFP vectors, cultured for three days and immunostained with the neuronal marker Tuj1 (red). When transfected with control vectors, few cells differentiated into neurons (A, E). After transfected with Mash1, most of P19 cells differentiated into Tuj1-positive neurons (B, E; arrows). The majority of cells transfected with FoxP2 did not express Tuj1 (C, E). Some of the cells cotransfected with Mash1 and FoxP2

were Tuj1-positive (D, E; arrows); some were not (D; arrow heads). (E) Data are ratio of neuronal differentiation of each group (percentage of Tuj1, GFP double-positive cells per GFP-positive cells) and presented as means  $\pm$  SE. Neuronal differentiation was significantly less in M+F group when compared to Mash1 only group (E). This suggests that FoxP2 alone did not promote neuronal differentiation and it may compete with the neurogenic effect by Mash1 in P19 cells. Scale bar: 50  $\mu$ m. \* compared with the control group; # compared with the Mash1 group. \*\* denotes  $p < .01$ ; # denotes  $p < .05$  ( $t$ -test).

E-box上，導致Mash1無法發揮轉錄功能。不管是哪種方式，本研究都開啟轉錄因子間調控關係的新一頁。

透過PDGFR $\alpha$ 中和抗體的實驗，我們證實了PDGF訊息傳導路徑的確位於FoxP2的下游。加上之前生物資訊的研究(Konopka *et al.*, 2009)，顯示PDGFR $\alpha$ 的確可能是FoxP2的目標基因。由於PDGF參與神經系統發育的多種調控，尤其是寡樹突細胞的分化，這暗示FoxP2可能也在這類細胞的發育上扮演重要角色。

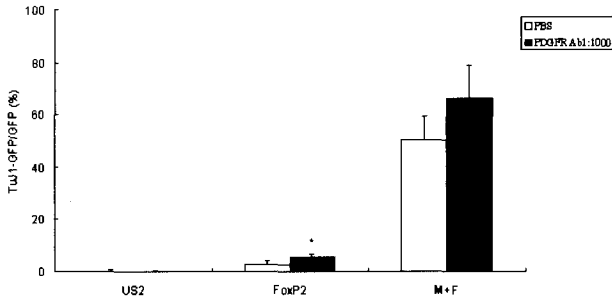
FoxP2已被指出與鳴禽、小鼠以及人類的發聲和語言功能有關。本研究更進一步顯示FoxP2在神經系統發育、甚至神經幹細胞上也扮演重要角色。對神經系統發育調控機制的瞭解，更可對以神經幹細胞來治療神經損傷和神經退化疾病提供幫助。

## 致謝

本研究經費來自國家科學委員會計畫「轉錄因子FoxP2對溫血脊椎動物出生後神經前趨細胞功能之探討」(NSC 99-2311-B-003 -001)，以及國立台灣師範大學新任教師之專題研究費「FoxP2對於出生後脊椎動物神經元新生的功能探討」。影像攝取感謝國立臺灣師範大學生命科學系分子影像核心實驗室的協助。質體來源感謝University of Michigan的Dr. David Turner和國立陽明大學俞震亞老師實驗室。

## 參考文獻

- Barkan S, Ayali A, Nottebohm F and Barnea A. 2007. Neuronal recruitment in adult zebra finch brain during a reproductive cycle. *Dev. Neurobiol.* 67: 687-701.



圖二、FoxP2 透過 PDGFR $\alpha$  來調控神經元分化。為了研究 FoxP2 是否透過 PDGFR $\alpha$  來調控神經元分化，P19 細胞分別轉殖 US2、FoxP2 或 Mash1 加上 FoxP2，每一組別並共轉殖 GFP 來標定轉殖成功細胞。在培養的三天中，並加入 PDGFR $\alpha$  的中和性抗體，之後以神經元專一蛋白 Tuj1 免疫染色的方式來看細胞分化成神經元的情形。當細胞轉殖入空質體 US2 後，幾乎沒有細胞分化成神經元。大多數轉殖入 FoxP2 的細胞並不會分化成神經元。但當在 FoxP2 轉殖組內加入 PDGFR $\alpha$  抗體後，則可增加該組的神經元分化。在共轉殖入 Mash1 和 FoxP2 的細胞當中，PDGFR $\alpha$  也有增加神經元分化的趨勢。圖為轉殖成功(表現 GFP)的細胞分化成神經元(同時表現 GFP 和 Tuj1)的比例，以平均加減標準誤呈現。\*表示  $p$  小於 0.05；與同轉殖質體的溶劑控制組比較。

**Figure 2.** To test whether PDGFR $\alpha$  acts downstream of FoxP2, P19 cells were transfected with control (US2), FoxP2 or Mash1 plus FoxP2 (M+F) along with EGFP vectors, cultured for three days with PDGFR $\alpha$  neutralizing antibody and immunostained with the neuronal marker Tuj1. When transfected with control vectors, few cells differentiated into neurons. The majority of cells transfected with FoxP2 did not express Tuj1. When treating these cells with PDGFR $\alpha$  neutralizing antibody, there were significantly more Tuj1-positive neurons. More than half of the cells cotransfected with Mash1 and FoxP2 were Tuj1-positive and the treatment of PDGFR $\alpha$  neutralizing antibody could cause a trend increase of Tuj1-positive neurons. This suggests that PDGFR $\alpha$  may be one of the downstream effector of FoxP2 in differentiating P19 cells. Data are ratio of neuronal differentiation of each group (percentage of Tuj1, GFP double-positive cells per GFP-positive cells) and presented as means  $\pm$  SE. \* compared with the PBS group transfected with the same plasmid; \* denotes  $p < .05$  ( $t$ -test).

Cameron HA, Hazel TG and McKay RD. 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurobiol.* 36: 287-306.

Doetsch F and Hen R. 2005. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15: 121-128.

Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S and Weiss S. 2004. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J. Neurosci.* 24: 8354-8365.

Erlandsson A, Enarsson M and Forsberg-Nilsson K. 2001. Immature Neurons From CNS Stem Cells Proliferate in Response to Platelet-Derived Growth Factor. *J. Neurosci.* 21: 3483-3491.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA and Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4: 1313-1317.

Farah MH, Olson JM, Sucic HB, Hume RL, Tapscott SJ and Turner DL. 2000. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* 127: 693-702.

Ferland RJ, Cherry TJ, Preware PO, Morrissey EE and Walsh CA. 2003. Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J. Comp. Neurol.* 460: 266-279.

Feuk L, Kalervo A, Lipsanen-Nyman M, Skaug J, Nakabayashi K, Finucane B, Hartung D, Innes M, Kerem B, Nowaczyk MJ, Rivlin J, Roberts W, Senman L, Summers A, Szatmari P, Wong V, Vincent JB, Zeesman S, Osborne LR, Cardy JO, Kere J, Scherer SW and Hannula-Jouppi K. 2006. Absence of a paternally inherited FOXP2 gene in developmental verbal dyspraxia. *Am. J. Hum. Genet.* 79: 965-972.

Fisher SE, Vargha-Khadem F, Watkins KE, Monaco AP and Pembrey ME. 1998. Localisation of a gene implicated in a severe speech and language disorder. *Nat. Genet.* 18: 168-170.

Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD and Vescovi AL. 1996. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 16: 1091-1100.

Haesler S, Rochefort C, Georgi B, Licznarski P, Osten P and Scharff C. 2007. Incomplete and inaccurate vocal imitation after knockdown of FoxP2 in songbird basal ganglia nucleus Area X. *PLoS Biol.* 512: e321.

- Haesler S, Wada K, Nshdejan A, Morrissey EE, Lints T, Jarvis ED and Scharff C. 2004. FoxP2 expression in avian vocal learners and nonlearners. *J. Neurosci.* 24: 3164-3175.
- Heldin CH, Ostman A, Eriksson A, Siegbahn A, Claesson-Welsh L and Westermark B. 1992. Platelet-derived growth factor: isoform-specific signalling via heterodimeric or homodimeric receptor complexes. *Kidney Int.* 41: 571-574.
- Heldin CH and Westermark B. 1989. Platelet-derived growth factor: three isoforms and two receptor types. *Trends Genet.* 5: 108-111.
- Hurst JA, Baraitser M, Auger E, Graham F and Norell S. 1990. An extended family with a dominantly inherited speech disorder. *Dev. Med. Child Neurol.* 32: 352-355.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S and Kageyama R. 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* 11: 1153-1161.
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, VandenBerg S and Alvarez-Buylla A. 2006. PDGFR alpha-positive B Cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51: 187-199.
- Kempermann G, Kuhn HG and Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-495.
- Konopka G, Bomar JM, Winden K, Coppola G, Jonsson ZO, Gao F, Peng S, Preuss TM, Wohlschlegel JA and Geschwind DH. 2009. Human-specific transcriptional regulation of CNS development genes by FOXP2. *Nature* 462: 213-217.
- Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F and Monaco AP. 2001. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 413: 519-523.
- Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Levy ER, Hodgson S, Fox M, Jeremiah S, Povey S, Jamison DC, Green ED, Vargha-Khadem F and Monaco AP. 2000. The SPCH1 region on human 7q31: genomic characterization of the critical interval and localization of translocations associated with speech and language disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 357-368.
- Lennon PA, Cooper ML, Peiffer DA, Gunderson KL, Patel A, Peters S, Cheung SW and Bacino CA. 2007. Deletion of 7q31.1 supports involvement of FOXP2 in language impairment: clinical report and review. *Am. J. Med. Genet. A* 143: 791-798.
- Li G, Wang J, Rossiter SJ, Jones G and Zhang S. 2007. Accelerated FoxP2 evolution in echolocating bats. *PLoS ONE* 2: e900.
- Lois C. and Alvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264: 1145-1148.
- MacDermot KD, Bonora E, Sykes N, Coupe AM, Lai CS, Vernes SC, Vargha-Khadem F, McKenzie F, Smith RL, Monaco AP and Fisher SE. 2005. Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. *Am. J. Hum. Genet.* 76: 1074-7080.
- McBurney MW, Jones-Villeneuve EM, Edwards MK, Anderson PJ (1982) Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* 299: 165-167.
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H and Hen R. 2006. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat. Neurosci.* 9: 729-731.
- Ming GL and Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28: 223-250.
- Nottebohm F. 2004. The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1016: 628-658.
- Rakic P. 2002. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of evidence. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 65-71.
- Paton JA and Nottebohm FN. 1984. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225: 1046-1048.
- Reynolds BA and Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710.
- Rochefort C, He X, Scotto-Lomassese S and

- Scharff C. 2007. Recruitment of FoxP2-expressing neurons to Area X varies during song development. *Develop. Neurobiol.* 67: 809-817.
- Rocheffort C, Gheusi G, Vincent JD and Lledo PM. 2002. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J. Neurosci.* 22: 2679-2689.
- Seaberg RM and van der Kooy D. 2002. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J. Neurosci.* 22: 1784-1793.
- Shim AH, Liu H, Focia PJ, Chen X, Lin PC and He X. 2010. Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107: 11307-11312.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T and Gould E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410: 372-376.
- Shriberg LD, Ballard KJ, Tomblin JB, Duffy JR, Odell KH and Williams CA. 2006. Speech, prosody, and voice characteristics of a mother and daughter with a 7;13 translocation affecting FOXP2. *J. Speech Lang. Hear. Res.* 49: 500-525.
- Shu W, Cho JY, Jiang Y, Zhang M, Weisz D, Elder GA, Schmeidler J, De Gasperi R, Sosa MA, Rabidou D, Santucci AC, Perl D, Morrisey E and Buxbaum JD. 2005. Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 9643-9648.
- Spiteri E, Konopka G, Coppola G, Bomar J, Oldham M, Ou J, Vernes SC, Fisher SE, Ren B and Geschwind DH. 2007. Identification of the transcriptional targets of FOXP2, a gene linked to speech and language, in developing human brain. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 1144-1157.
- Takakura N, Yoshida H, Ogura Y, Kataoka H, Nishikawa S and Nishikawa S. 1997. PDGFR alpha expression during mouse embryogenesis: immunolocalization analyzed by whole-mount immunohistostaining using the monoclonal anti-mouse PDGFR alpha antibody APA5. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 883-893.
- Teramitsu I, Kudo LC, London SE, Geschwind DH and White SA. 2004. Parallel FoxP1 and FoxP2 expression in songbird and human brain predicts functional interaction. *J. Neurosci.* 24: 3152-3163.
- Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tanii M, Okano S, Kaneko K, Hasegawa M, Hashizume M, Maehara Y and Sueishi K. 2004. Essential role of PDGFRalpha-p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFRalpha during angiogenesis. *Circ. Res.* 94: 1186-1194.
- Valenzuela CF, Kazlauskas A and Weiner JL. 1997. Roles of platelet-derived growth factor in the developing and mature nervous systems. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 24: 77-89.
- Vernes SC, Spiteri E, Nicod J, Groszer M, Taylor JM, Davies KE, Geschwind DH and Fisher SE. 2007. High-throughput analysis of promoter occupancy reveals direct neural targets of FOXP2, a gene mutated in speech and language disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 1232-1250.
- White SA, Fisher SE, Geschwind DH, Scharff C and Holy TE. 2006. Singing Mice, songbirds, and more: models for FOXP2 function and dysfunction in human speech and language. *J. Neurosci.* 26: 10376-10379.
- Williams LT. 1989. Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science* 243: 1564-1570.
- Xie J, Aszterbaum M, Zhang X, Bonifas JM, Zachary C, Epstein E and McCormick F. 2001. A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 9255-9259.
- Yu JY, Chung KH, Deo M, Thompson RC and Turner DL. 2008. MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp. Cell Res.* 314: 2618-2633.
- Zeesman S, Nowaczyk MJ, Teshima I, Roberts W, Cardy JO, Brian J, Senman L, Feuk L, Osborne LR and Scherer SW. 2006. Speech and language impairment and oromotor dyspraxia due to deletion of 7q31 that involves FOXP2. *Am. J. Med. Genet. A* 140: 509-514.
- Zhang J, Cao R, Zhang Y, Jia T, Cao Y and Wahlberg E. 2009. Differential roles of PDGFR-alpha and PDGFR-beta in angiogenesis and vessel stability. *FASEB J.* 23: 153-163.

## **FoxP2 Regulates Neuronal Differentiation Through Platelet-derived Growth Factor Signaling Pathway in P19 Cells**

Ming-Yang Li, Ming-Syuan Li, Tsu-Wei Wang\*  
Department of Life Science, National Taiwan Normal University  
Taipei, Taiwan

(Received: 2 May 2011, accepted: 11 May 2011)

### **ABSTRACT**

FoxP2 is a transcription factor involved in vocal behaviors. During adult neurogenesis in songbirds, FoxP2 is expressed by neural progenitor cells and newly generated neurons in Area X, an area for song learning. However, whether FoxP2 regulates neurogenesis and the mechanism remain unclear. We tested this hypothesis by overexpressing FoxP2 in a mouse embryonic carcinoma cell line P19 to examine whether it regulates neurogenesis. We found that FoxP2 did not promote neuronal differentiation. We also identified that Platelet-derived growth factor (PDGF) pathway could be one of the downstream effector of FoxP2 during neuronal differentiation. Taken together, FoxP2 may play important roles during neural development. A better understanding of neurogenesis in the mammalian brain should provide insight into regulatory mechanisms and lead to strategies for brain repair.

**Keywords:** FoxP2, neural development, neurogenesis