

Verhaltensgenetik

Die Zebrafisch *fgfr1a*-Mutante zeigt eine genetische Basis der Aggression

WILLIAM H. J. NORTON, LAURE BALLY-CUIF
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS),
GIF-SUR-YVETTE CEDEX, FRANKREICH

We show that mutation of fibroblast growth factor receptor 1a simultaneously increases aggression, boldness and exploration in adult zebrafish. Reduction of Fgf signalling is correlated with a reduction of histamine levels in the mutant brain. Pharmacological increase of histaminergic signalling rescues the behavioural phenotype. This work demonstrates that a single genetic locus can link three components of the aggression-boldness behavioural syndrome.

10.1007/s12268-012-0143-6
© Springer-Verlag 2012



■ Unter einem „Verhaltenssyndrom“ fasst man Gruppen von zwei oder mehr Verhaltensweisen zusammen, die sich unter verschiedenen Umweltbedingungen in ähnlicher Weise ausprägen. Mit diesem Konzept kann man schlecht angepasste Verhaltensweisen erklären; es ist aber eher rätselhaft, wenn man es aus einem evolutionären Blickwinkel betrachtet. Die Abwesenheit gekoppelter Verhaltensweisen hätte für Tiere einen selektiven Vorteil, da sie sowohl eine optimale Anpassung an die Umwelt erlaubt [1], als auch in jeder Situation eine angemessene Ausprägung der Verhaltensweise ermöglicht (z. B. Aggressionen gegenüber Rivalen zu zeigen, aber nicht gegenüber Nachkommen oder Partnern).

In einer bahnbrechenden Untersuchung beschrieb Felicity Huntingford 1976 erstmalig das Aggressions-Verwegenheits-Syndrom in Stichlingen (*Gasterosteus aculeatus*) [2]. Sie identifizierte eine positive Korrelation zwischen Aggression und Verwegenheit in einer Fischpopulation: Aggressive Tiere sind auch verwegener (weniger ängstlich) und in einer neuen Umgebung neugieriger. Aggression, gekoppelt mit Verwegenheit, wurde auch in Säugern, Vögeln und anderen Fischen beschrieben. Eine derartige Kopplung von Verhaltensweisen kann durch zwei Mechanismen verursacht sein: durch die pleiotrope Wirkung eines Gens, das gleichzeitig verschiedene Verhaltensweisen beeinflusst [3], oder durch die Notwendigkeit für ein Tier, sich optimal an seine Umwelt anzupassen [4].

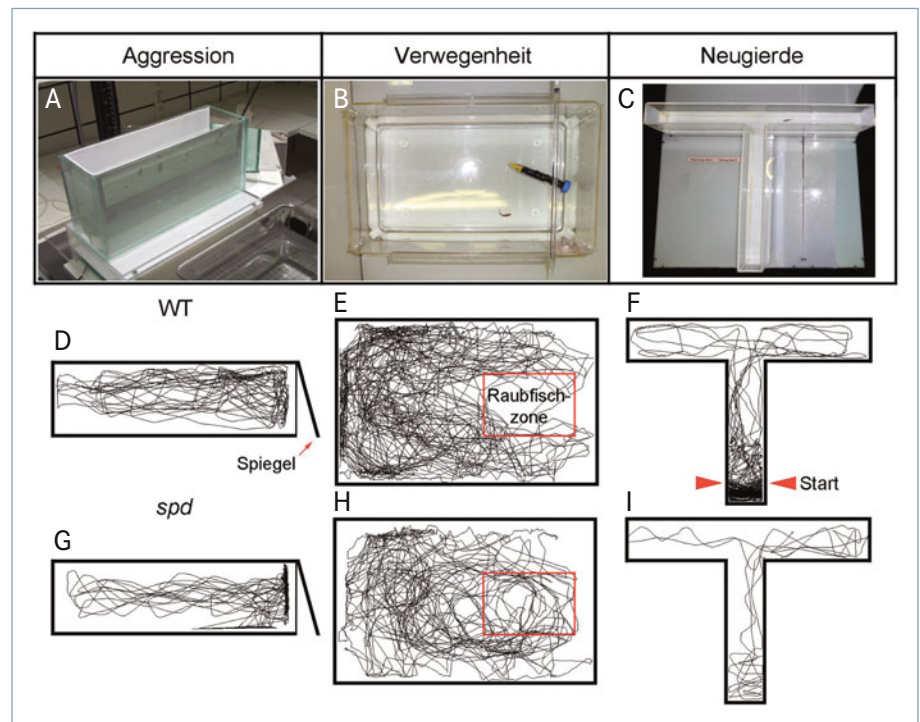
Im Zebrafisch (*Danio rerio*) schwankt die Beziehung zwischen Aggression und Verwegenheit in Abhängigkeit von dem jeweils betrachteten Stamm [5]. Zebrafische zeigen ihre Aggression durch das Aufrichten der Flossen, durch schnelles Schwimmen für eine

◀ **Abb. 1:** Darstellung aggressiven Verhaltens beim Zebrafisch. Die Bilder zeigen charakteristische aggressive Interaktionen mit einem Spiegel (an der linken Seite). Weitere Erklärungen im Text.

kurze Zeit, durch das Schlagen mit dem Schwanz und durch den Versuch, einen Rivale zu beißen (**Abb. 1**). Man kann Aggression sowohl in männlichen als auch in weiblichen Fischen beobachten, abhängig von den Zuchtbedingungen und der Komplexität des Lebensraums. Verwegenheit kann man durch die Zahl der Annäherungsversuche an ein neues Objekt im Aquarium bestimmen [6]. Aus diesen Tatsachen können wir zunächst schließen, dass beide Verhaltensweisen unter genetischer Kontrolle stehen [5, 6].

Das Verhalten der *spd*-Mutanten

In diesem Kontext untersuchten wir *spiegeldanio* (*spd*), eine Zebrafisch-Mutante mit verminderter Funktion des Rezeptors 1a für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Fgf1a) [7]. Während der täglichen Betreuung der Fische beobachteten wir, dass die *spd*-Mutanten eine verstärkte Neigung zeigten, andere Fische zu töten oder zu beißen. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, haben wir das aggressive Verhalten gemessen, indem wir die Interaktionen mit einem Spiegel analysierten (**Abb. 2A**, [8]). Zebrafische sind nicht in der Lage, ihr eigenes Spiegelbild zu erkennen, und so greifen sie es an, als ob ein Rivale im Aquarium wäre. Homozygote *spd*-Mutanten sind deutlich aggressiver als Wildtyp-Zebrafische und verbringen mehr Zeit damit, gegen den Spiegel zu beißen oder dagegen zu drücken ($p = 0,04$; Wildtyp: $n = 12$, *spd*-Mutanten: $n = 10$; **Abb. 2D, G**). Um „Verwegenheit“ zu testen, haben wir die Zeitdauer gemessen, die der Fisch in der Nähe eines neuen Objekts im Aquarium verbringt (ein Plastikmodell eines Raubfisches; **Abb. 2B**). Homozygote *spd*-Fische hielten sich im Vergleich mit dem Wildtyp signifikant länger im Umkreis einer Körperlänge des neuen Objekts auf ($p = 0,04$; Wildtyp: $n = 19$, *spd*-Mutanten: $n = 17$; **Abb. 2E, H**). Als Nächstes untersuchten wir die Neugierde in einer neuen Umgebung, einem großen T-förmigen Aquarium (**Abb. 2C**). Wir zeichneten die Zeitdauer auf, die der Fisch benötigte, um bis auf eine Körperlänge an das jeweilige Ende des Aquariums zu schwimmen. Homozygote *spd*-Mutanten erkundeten diese Umgebung in signifikant kürzerer Zeit als ihre Wildtyp-Geschwister ($p = 0,0003$; Wildtyp: $n = 10$, *spd*-Mutanten: $n = 10$); sie zeigten also eine erhöhte Neugierde (**Abb. 2F, I**). Eine Störung des Fgf-Signalweges in den *spd*-Fischmutanten ist also mit einer gleichzeitigen Zunahme von Aggression, Verwegenheit und Neugierverhalten verbunden.



▲ **Abb. 2:** Die Mutante *spiegeldanio* ist aggressiver, verwegener und neugieriger als Wildtyp-Fische. **A**, Bild eines Aquariums zum Messen aggressiven Verhaltens (Seitenansicht). Der Spiegel ist an der rechten Seite der Anlage angebracht. **B**, Bild eines Aquariums zum Messen von Verwegenheit gegenüber einem neuen Objekt, das rechts zu sehen ist (Ansicht von oben). **C**, Bild eines Aquariums zum Messen von Neugierverhalten (Ansicht von oben). **D–F**, repräsentative Bildspur des Schwimmverhaltens eines Wildtyp-Fisches in der Messanordnung für Aggression (**D**), für neue Objekte und Verwegenheit (**E**) und für Neugierde (**F**). **G–I**, repräsentative Bildspur des Schwimmverhaltens einer *spd*-Mutante in der Messanordnung für Aggression (**G**), für neue Objekte und Verwegenheit (**H**) und für Neugierde (**I**).

Veränderungen im Gehirn der *spd*-Mutanten

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Fgf) sind wichtige Signalmoleküle. Um den Defekt im Fgf-Signalweg in den *spd*-Mutanten zu untersuchen, analysierten wir die Aktivität von zwei Genprodukten, die die Fgf-Aktivität im erwachsenen Gehirn umsetzen, die Phosphatase-Aktivität von DUSP6 (*dual specificity phosphatase 6*) und die Menge der phosphorylierten Form von ERK, pERK (*phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*). Wir beobachteten eine Verminderung sowohl der DUSP6-Expression (durch *in situ*-Hybridisierung) als auch der pERK-Menge (durch Immunfluoreszenz) innerhalb des Nucleus periventricularis im Hypothalamus. Der Hypothalamus ist eine wichtige Gehirnregion, die mit dem endokrinen System im Austausch steht und viele Verhaltensweisen kontrolliert. Interessanterweise wurde der Nucleus periventricularis bereits früher mit der Kontrolle aggressiven Verhaltens in Fischen in Verbindung gebracht. Elektrische Reizung dieser Region des Hippocampus im Blauen Sonnen-

barsch (*Lepomis macrochirus*) bewirkt eine Zunahme aggressiven Verhaltens [9].

Die *spd*-Mutanten haben erniedrigte Histaminspiegel

Schließlich untersuchten wir Neurotransmitterwege, die die Fgf-Signalkette im Hypothalamus und die beobachteten Verhaltensänderungen verbinden könnten. Mithilfe der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) bestimmten wir die Expression von 40 Komponenten des Dopamin-, Serotonin-, Noradrenalin- und des Histaminweges. Zwar zeigte die Mehrzahl der Gene keine Unterschiede in ihrer Expression, aber das Gen, das die Histamin-N-Methyltransferase (hnm1) codiert, war in den *spd*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp signifikant hochreguliert (Faktor 1,06; $p = 0,007$; $n = 10$ Gehirne pro Genotyp). Hnm1 beendet die Histamin-Signalkette im Gehirn; dazu methyliert es Histamin (HA) zu N-Methylhistamin. Die Analyse der Neurotransmitterkonzentrationen mithilfe eines Radioimmunoassays und mit einem HA-spezifischen Antikörper bestätigte die Erniedrigung

drigung der HA-Konzentration, und zwar um 45 Prozent ($p = 0,0001$; $n = 5$ Gehirne pro Genotyp).

Wir behandelten schließlich die homozygoten *spd*-Mutanten mit einer nicht sedierenden Dosis eines hnm-Inhibitors, Tacrinhydrochlorid (kurz: Tacrin) [10], und beobachteten einen Anstieg der HA-Konzentration im Gehirn; die Histaminkonzentration in den Tacrin-behandelten Mutanten unterscheidet sich nicht von den behandelten Wildtyp-Fischen. Die Verhaltenstests zeigten, dass die Behandlung mit Tacrin in den Wildtypen weder das aggressive noch das verwegene Verhalten gegenüber neuen Objekten beeinflusst; es verminderte diese Verhaltensweisen aber in homozygoten *spd*-Mutanten. Die Tacrin-Behandlung erhöhte ebenso die Erkundungszeit in Wildtypen und homozygoten *spd*-Mutanten und bringt damit beide Genotypen auf dasselbe Niveau.

Fazit

Die Verhaltensanalyse der Zebrafischmutante *spd* wirft mehrere interessante Fragen auf, die mit der Bildung und Aufrechterhaltung der Verhaltenssyndrome verbunden sind: Erstens haben wir gezeigt, dass die Modifikation eines einzigen Gens, *fgfr1a*, ausreichend ist, um gleichzeitige Veränderungen in drei Verhaltensweisen zu erzeugen (pleiotroper Effekt). Dennoch kann, wie in einer kürzlichen Studie an Stichlingen gezeigt wurde, die Korrelation zwischen Aggression und Verwegenheit in Abhängigkeit der Umgebung variieren, in der die Fische getestet wurden [4]. Es erscheint deshalb wahrscheinlich, dass eine Kombination von genetischen Bedingungen und Umweltbedingungen die Ausbildung von Verhaltenssyndromen bewirkt. Zweitens: Obwohl die Fgf-Signalkette in den *spd*-Mutanten lebenslang vermindert ist, hat diese Abnahme scheinbar keine Auswirkung auf die Lebensspanne der Fische, zumindest nicht unter Laborbedingungen. Außerdem werden die Veränderungen im Verhalten der erwachsenen Tiere nicht von embryonalen Entwicklungsstörungen begleitet.

Obleich verstärkte Aggression manchmal als eine negative Eigenschaft angesehen wird, könnte man das offensichtliche Fehlen negativer Konsequenzen so verstehen, dass der *spd*-Verhaltensphänotyp eher ein extremes Beispiel gewöhnlichen Verhaltens darstellt. Schließlich erscheint der *spd*-Verhaltensphänotyp zumindest teilweise dadurch verursacht zu sein, dass die Histamin-Signalkette im Gehirn vermindert ist. Histamin wurde schon früher mit verschiedenen Verhaltensweisen in Verbindung gebracht; dazu gehören Schlaf-Wach-Zyklen, Aggression, Neugierverhalten und Verwegenheit. So könnte Histamin eher als ein allgemeiner Regulator von Gehirnaktivitäten wirken, ohne dabei spezifische Verhaltensweisen zu beeinflussen. Im Zusammenhang mit einer Vielzahl kürzlich veröffentlichter Studien über das Verhalten von Zebrafischen zeigt diese Arbeit, dass erwachsene Zebrafische auch ideale Modellorganismen sind, um den Einfluss von Genen auf das Verhalten zu untersuchen [11]. ■

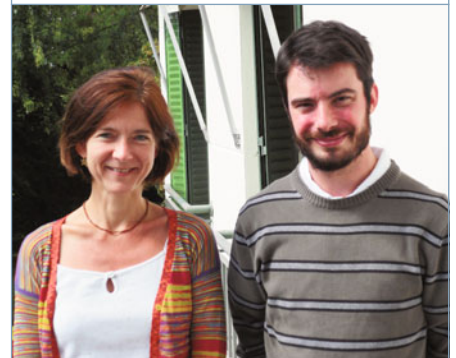
Literatur

- [1] Sih A, Bell A, Johnson JC (2004) Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends Ecol Evol* 19:372–378
- [2] Huntingford FA (1976) The relationship between anti-predator behaviour and aggression among conspecifics in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Anim Behav* 24:245–260
- [3] Ketterson ED, Nolan V (1992) Hormones and life histories: an integrative approach. *Am Nat* 140 (Suppl 1):S33–S62
- [4] Bell AM (2005) Behavioural differences between individuals and two populations of stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *J Evol Biol* 18:464–473
- [5] Moretz JA, Martins EP, Robison BD (2007) Behavioural syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. *Behav Ecol* 18:556–562
- [6] Wright D, Nakamichi R, Krause J et al. (2006) QTL analysis of behavioral and morphological differentiation between wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Genet* 36:271–284
- [7] Rohner N, Bercsényi M, Orbán L et al. (2009) Duplication of *fgfr1* permits Fgf signaling to serve as a target for selection during domestication. *Curr Biol* 19:1642–1647
- [8] Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A (2000) Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67:773–782
- [9] Demski LS, Knigge KM (1971) The telencephalon and hypothalamus of the bluegill (*Lepomis macrochirus*): evoked feeding, aggressive and reproductive behavior with representative frontal sections. *J Comp Neurol* 143:1–16
- [10] Horton JR, Sawada K, Nishibori M et al. (2005) Structural basis for inhibition of histamine N-methyltransferase by diverse drugs. *J Mol Biol* 353:334–344
- [11] Norton W, Bally-Cuif L (2010) Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neurosci* 11:90

Korrespondenzadresse:

Dr. William H. J. Norton
 Dr. Laure Bally-Cuif
 Centre national de la recherche scientifique (CNRS)
 Institut de Neurobiologie Alfred Fessard
 Laboratory Neurobiology and Development
 Zebrafish Neurogenetics
 Avenue de la Terrasse
 F-91190 Gif-sur-Yvette, Cedex
 Tel.: +33-(0)169-824292
 Fax: +33-(0)169-8242
 norton@inaf.cnrs-gif.fr
 bally-cuif@inaf.cnrs-gif.fr

AUTOREN



Laure Bally-Cuif, William H. J. Norton

Laure Bally-Cuif

Jahrgang 1967. 1987–1991 Studium der Molekular- und Zellbiologie an der Ecole Normale Supérieure und der Universität Paris, Frankreich. 1994 Promotion am Hôpital de la Salpêtrière, Paris. 1995–1997 Postdoc Princeton University (USA). 1997–2009 Gruppenleiterin und Abteilungsleiterin am Helmholtz-Zentrum München. Ab 2009 Forschungsdirektorin am CNRS in Gif-sur-Yvette, Frankreich.

William H. J. Norton

Jahrgang 1978. Studium der Biologie an der University of Sheffield, UK. 2002 Promotion am University College London, UK. 2002–2005 Postdoc am EMBL in Heidelberg und im Labor von Dr. L. Bally-Cuif. 2006–2009 Helmholtz-Zentrum München. Seit 2009 CNRS in Gif-sur-Yvette, Frankreich.