

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

**Evaluation des modified Hole Boards als Primärscreen für mutante  
Mauslinien**

Magdalena Kallnik

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung  
des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst
2. Univ.-Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis

Die Dissertation wurde am 19.11.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 21.01.2008 angenommen.



*Meiner Oma*



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1	Von Genotypen und Phänotypen	8
1.2	Umfassende Phänotypisierung – Die German Mouse Clinic	10
1.3	Die Suche nach Verhaltensprofilen – Das Verhaltensmodul und die Endophänotypen	11
1.4	Unkonditioniertes Verhalten bei Nagern: Der modified Hole Board Test – Hintergrund, Testaufbau und Datenlage	13
1.5	Eigene Untersuchungen – Hintergrund, Zielsetzung und Konzepte	17
1.5.1	Teil 1: Validierung des modified Hole Boards	20
1.5.2	Teil 2: Einfluss von IVC-Käfighaltung	23
1.5.3	Teil 3: Nützlichkeit des mHB als Primärscreen in der German Mouse Clinic	25
<b>2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
2.1	Teil 1: Validierung des modified Hole Boards	31
2.1.1	Direkter Vergleich von <i>Open Field</i> zu mHB	31
2.1.2	Einfluss des <i>Boards</i> in der mHB-Arena auf angstkorreliertes Verhalten	33
2.1.3	Einfluss der Blindheit bei C3H Mäusen auf das Verhalten im mHB	35
2.2	Teil 2: Einfluss von IVC-Käfighaltung	37
2.2.1	Untersuchungen an Männchen in Einzelhaltung	37
2.2.2	Untersuchungen an Mäusen beider Geschlechter in Gruppenhaltung	43
2.3	Teil 3: Nützlichkeit des mHB im Verhaltensprimärscreen der German Mouse Clinic	46
2.3.1	Vergleich mit bereits publizierten Phänotypen – der PWD/PH Stamm und die CRHR1 knockout Mauslinie	46
2.3.2	Effizienz im Primärscreen – mutante Mauslinien innerhalb des GMC-Workflows	52
2.3.3	Vom Primär- zum Sekundär-/Tertiärscreen: Verhaltensanalyse der Gene-Trap Mauslinie W04406 (Neurochondrin)	57
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
3.1	Teil 1: Validierung des modified Hole Boards	70
3.1.1	mHB erhöht Lokomotion und beeinflusst Angstparameter	70
3.1.2	Das <i>Board</i> – Physikalische Beschaffenheit des Zentrums verändert Angstparameter	72

3.1.3	mHB-Baselines sind geeignet zur Detektion von Genotypenunterschieden	73
3.1.4	Intakte Sehfähigkeit ermöglicht <i>früheren</i> Gebrauch des Verhaltensrepertoirs	74
<b>3.2</b>	<b>Teil 2: Einfluss von IVC-Käfighaltung</b>	<b>77</b>
3.2.1	IVC reduziert Aktivität und verstärkt Angstverhalten einzelngelaltener Männchen	77
3.2.2	IVC erhöht akustischen Schreckreflex einzelngelaltener C3H Männchen	79
3.2.3	IVC mit Klettermöglichkeiten fördert Furchtpotentierung einzelngelaltenen B6J Männchen	80
3.2.4	Vorteile: Testbatterie und Absolutwerte von Verhaltensparametern	81
3.2.5	IVC erschwert Detektion anxiogener Effekte bei einzelngelaltenen Männchen	82
3.2.6	Anders als B6J Männchen: IVC reduziert Angstverhalten bei B6J Weibchen	83
3.2.7	Gruppenhaltung – Kompensiert IVC-Effekte bei C3H Männchen	85
<b>3.3</b>	<b>Teil 3: Nützlichkeit des mHB im Verhaltensprimärscreen der German Mouse Clinic</b>	<b>86</b>
3.3.1	PWD/Ph-Verhaltensphänotyp auf Weibchen und Sozialverhalten ausgedehnt	87
3.3.2	CRHR1 ko-Verhaltensphänotyp auf erhöhtes Explorationsniveau erweitert	89
3.3.3	mHB sensitiv für die Detektion von Verhaltensphänotypen	91
3.3.4	mHB liefert bedarfsgerechte Spannweite zur Phänotypendetektion im Primärscreen	91
3.3.5	W04406 (Neurochondrin) Linie: Erfolgreiche Reproduktion der Primärphänotypisierung	93
3.3.6	Sozialverhalten mutanter Ncdn Weibchen im mHB verändert sekundär Angstparameter	94
3.3.7	Angstphänotyp in Ncdn Mutanten nicht detektierbar	94
3.3.8	Aktive soziale Interaktion: Ncdn ko Weibchen verhalten sich wie Männchen	95
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1</b>	<b>Tiere und Tierhaltung</b>	<b>103</b>
<b>5.2</b>	<b>Verhaltenstests</b>	<b>104</b>
5.2.1	Allgemeines	104
5.2.2	modified Hole Board	105
5.2.3	Open Field	107

5.2.4	Elevated Plus Maze	108
5.2.5	Light Dark Box	109
5.2.6	Startle Tests	111
5.2.6.1	<i>Fear Potentiated Startle</i>	111
5.2.6.2	<i>Acoustic Startle Reflex</i>	113
5.2.7	Social Discrimination	114
5.2.8	Social Interaction	116
5.2.9	Test für die Wahrnehmung des Geruchs eines Artgenossen	117
<b>5.3</b>	<b>Versuchsdurchführung</b>	<b>119</b>
5.3.1	Teil 1: Validierung des modified Hole Boards	119
5.3.1.1	<i>Direkter Vergleich von Open Field zu mHB</i>	119
5.3.1.2	<i>Einfluss des Boards in der mHB-Arena auf angstkorreliertes Verhalten</i>	119
5.3.1.3	<i>Einfluss der Blindheit bei C3H Mäusen auf das Verhalten im mHB</i>	119
5.3.2	Teil 2: Einfluss von IVC-Käfighaltung	120
5.3.2.1	<i>Untersuchungen an einzelgehaltenen Männchen</i>	120
5.3.2.2	<i>Untersuchungen an gruppengehaltenen Mäusen beider Geschlechter</i>	120
5.3.3	Teil 3: Nützlichkeit des mHB als Primärscreen in der German Mouse Clinic	121
5.3.3.1	<i>Vergleich mit bereits publizierten Phänotypen – der PWD/PH Stamm und. die CRHR1 knockout Mauslinie</i>	121
5.3.3.2	<i>Effizienz im Primärscreen – mutante Mauslinien innerhalb des GMC-Workflows</i>	122
5.3.3.3	<i>Vom Primär- zum Sekundär-/Tertiärscreen: Verhaltensanalyse der Gene-Trap Mauslinie W04406 (Neurochondrin)</i>	123
<b>5.4</b>	<b>Statistik</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>139</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>141</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>143</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Von Genotypen und Phänotypen

Mit der vollständigen Sequenzierung (Entschlüsselung) des menschlichen Genoms im Jahre 2001 (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001) und der Genome einiger anderer Spezies, liegt die größte Herausforderung der biomedizinischen Forschung nun in der Aufklärung der Funktion der Gene und der Proteine. Dabei stellt die Maus das meist genutzte Tiermodell dar im Bemühen um die funktionelle Aufklärung des Genoms und um die Anwendung dieses Wissens auf menschliche Krankheitsbilder, um deren zugrunde liegenden physiologischen sowie pathologischen Ursachen besser verstehen zu können (Nadeau et al. 2001; O'Brien and Woychik 2003; Nobrega and Pennacchio 2004).

Mäuse sind Säugetiere und haben 99% ihres Genoms mit dem menschlichen gemein (Austin et al. 2004), darüber hinaus ist ihre Reproduktionszeit kurz und sie geben viele Nachkommen, sind platzsparend und finanziell günstig - nach Vorgaben des Tierschutzes - zu halten, und über ihre Genetik sowie ihr Verhalten herrscht bereits einiges an Wissen (Crawley et al. 1997; Rossi-Arnaud and Ammassari-Teule 1998). Zudem können aufgrund von über Generationen angewendeten Geschwisterverpaarungen Inzuchtlinien gezüchtet werden. Diese Inzuchtlinien haben den Vorteil, dass das Genom der Individuen einer Linie isogen, d.h. genetisch identisch ist. Damit sollte der Phänotyp, also das charakteristische morphologische, physiologische und verhaltensmäßige Erscheinungsbild eines Individuums, der Kohorte einer Inzuchtlinie homogener sein, als bei der Kohorte, die aus nicht genetisch identischen Individuen besteht. Die Homogenität des Phänotyps ist besonders geeignet, um unter kontrollierten/standardisierten Laborbedingungen in der Verhaltensneurobiologie die Zusammenhänge zwischen Verhalten und Hirnfunktionen zu untersuchen (Crawley et al. 1997; Rossi-Arnaud and Ammassari-Teule 1998). Damit hat die Maus als Modellorganismus Vorteile gegenüber klinischen Studien und ergänzt sie, wo sich aus ethischen Gründen verbieten. Im Gegensatz zu klinischen Studien ist die Forschung an Tiermodellen im Hinblick auf einheitliche Kohorten und standardisierte Durchführungen einfacher zu kontrollieren.

Der größte Vorteil der Maus als Modellorganismus ist die Tatsache, dass in ihr Genom mit gentechnischen Methoden eingegriffen werden kann. Dabei unterscheidet man zwischen zwei grundlegenden Ansätzen der Mutagenesemethodik, der Gen-gesteuerten und der Phänotyp-gesteuerten. Bei ersterer wird hypothesengeleitet ein Gen, das z.B. wie DJ-1 mit einer



Krankheit wie Parkinson in Verbindung gebracht wird (Bonifati et al. 2003), seit den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen von Mäusen gezielt manipuliert (Goldstein 2001) und die Wirkung der Manipulation in den genveränderten, mutanten Mäusen gegenüber nicht betroffenen Geschwistern untersucht (Chen et al. 2005). Damit bietet dieser Gen- (*gene-driven*) und hypothesengesteuerte Ansatz Einblicke in die Funktion/en schon bekannter Gene und ermöglicht deren Analyse. Im Laufe der Jahre wurden unterschiedliche gentechnische Methoden entwickelt, mit denen Kandidatengene ab der Zygote oder sogar erst später in der Mausentwicklung zeit- bzw. gewebespezifisch manipuliert werden können (Goldstein 2001; Stanford et al. 2001; Hansen et al. 2003; Austin et al. 2004; Branda and Dymecki 2004; Kuhn et al. 2007).

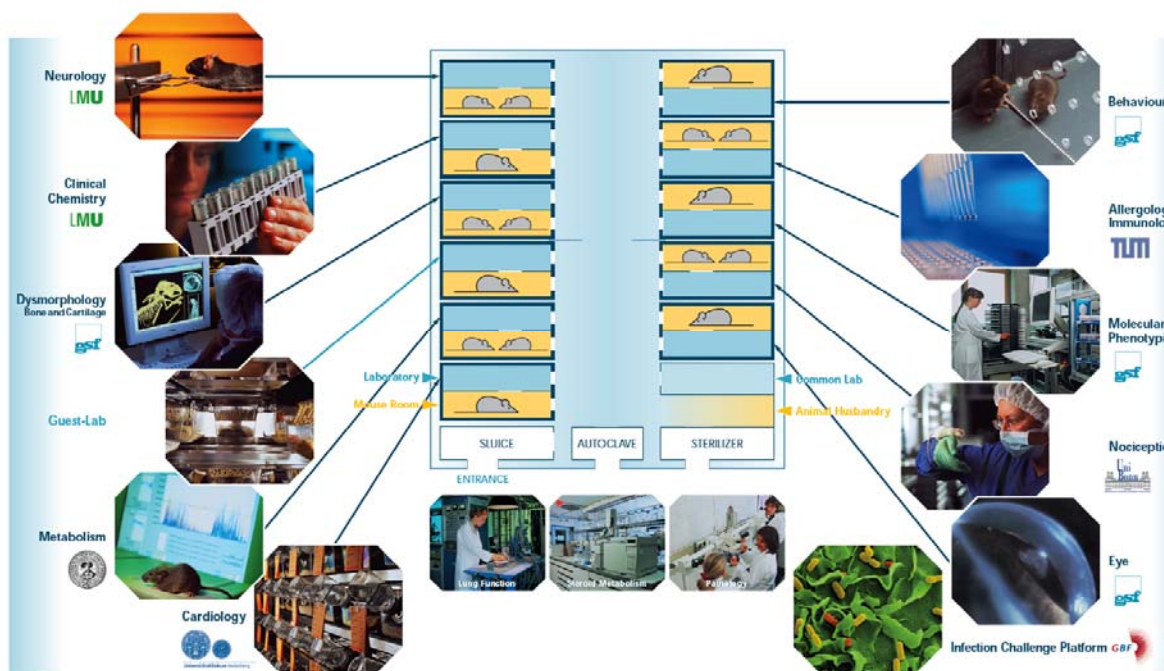
Der zweite Ansatz der Mutagenesemethodik, das ENU-Projekt u.a. am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) in Neuherberg, ist hypothesenfrei und auf die Identifikation noch nicht bekannter Kandidatengene über interessante Phänotypen ausgelegt (Hrabe de Angelis et al. 2000; Soewarto et al. 2000; O'Brien and Frankel 2004). Hier werden Genmutationen mit Hilfe des Mutagens Ethyl-Nitrosoharnstoff (ENU) an prämeiotischen spermatogenen Stammzellen von männlichen Mäusen (Russell 1989) erstellt. Das ENU bewirkt nach dem Zufallsprinzip eine Alkylierung der Basen der Erbsubstanz; diese Veränderungen im Genom werden als Punktmutationen weitervererbt (Nolan et al. 2000; Balling 2001). Die Nachkommen werden anschließend auf interessante Phänotypen untersucht. Allerdings zeigen nur 2% der Mäuse einen relevanten und stabilen Phänotyp. Diese werden weitergezüchtet und erst bei immer noch vorhandener Penetranz des Phänotyps wird nach dem veränderten Gen mit Hilfe genetischer Marker gesucht. Da man bei diesem Ansatz vom Phänotyp in Richtung des Genotyps untersucht, nennt man ihn Phänotyp-gesteuert (*phenotype-driven*). Einige interessante Phänotypen konnten schon identifiziert werden (Vitaterna et al. 1994; Antoch et al. 1997; Brown and Hardisty 2003; Abe et al. 2006; Reijmers et al. 2006).

Inzwischen werden mutante Mauslinien nicht nur innerhalb des ENU-Projektes, sondern auch in anderen Großprojekten wie z.B. EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Program, <http://www.eucomm.org>) und NorCOMM (North American Conditional Mouse Mutagenesis project, <http://norcomm.phenogenomics.ca>), bei welchen insgesamt ca. 18000 - 20000 Gene konditional in embryonalen Stammzellen mutiert werden sollen, im Großmaßstab hergestellt.

Auf der Suche nach den genetischen Grundlagen körperinterner und –externer Vorgänge beginnt mit der Erstellung einer mutanten Mauslinie die eigentliche Arbeit: die Untersuchung ihres Phänotyps und die Korrelation Phänotyp-Genotyp. Alles in Allem ergibt sich ein steigender Bedarf an Phänotypisierungsvorrichtungen für die Analysen der Mausmutanten (Auwerx et al. 2004; Brown et al. 2006).

## 1.2 Umfassende Phänotypisierung – Die German Mouse Clinic

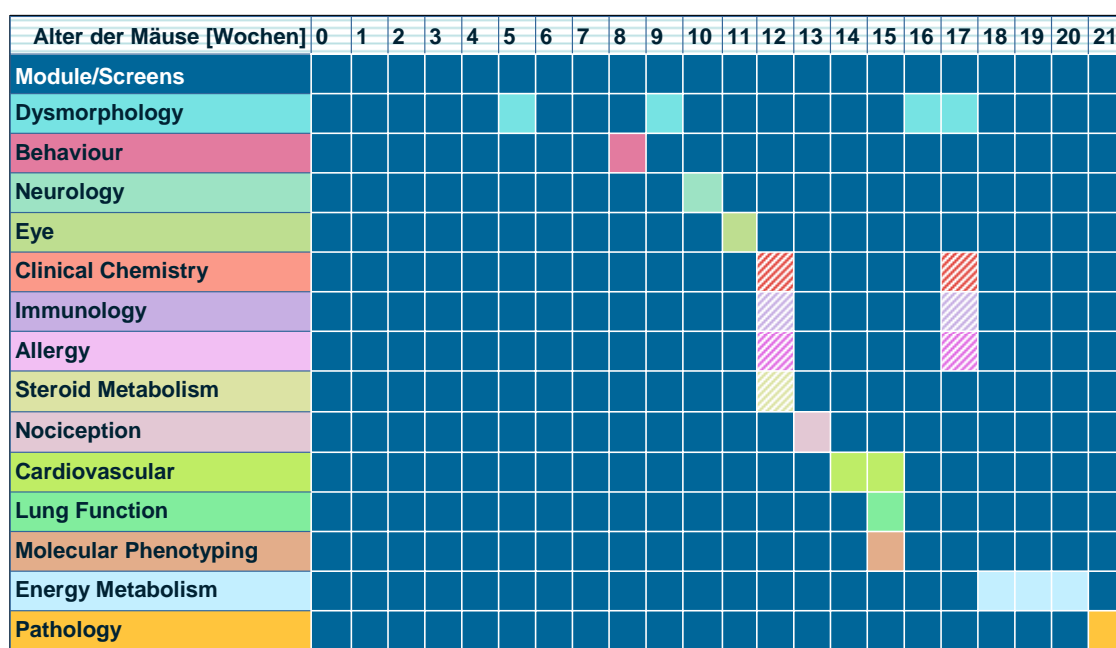
Vor einigen Jahren wurde mit der German Mouse Clinic (GMC) eine solche Phänotypisierungseinheit als offen zugängliche Plattform mit standardisierten Phänotypisierungsmethoden etabliert (Gailus-Durner et al. 2005). Konzeptionell arbeiten in der GMC Wissenschaftler aus unterschiedlichen Gebieten der Mausgenetik, Physiologie und Pathologie zusammen unter einem Dach (**Abb. 1**).



**Abbildung 1: Die German Mouse Clinic (GMC):** Die unterschiedlichen Phänotypisierungsmodule sind innerhalb eines Gebäudekomplexes nebeneinander untergebracht, sodass der Mastransfer zwischen den Modulen ungehindert und die Zusammenarbeit unterschiedlicher Fachgebiete der Mausanalyse ermöglicht ist (<http://www.mouseclinic.de>).

Alle zwei Wochen wird eine neue Mauslinie im so genannten Primärscreen analysiert. Um einen möglichst umfassenden ersten Überblick über einen möglichen Phänotyp (Primärphänotyp) des Gesamtorganismus zu erhalten, durchlaufen die Mauslinien einen

standardisierten Phänotyp-Check mit insgesamt ca. 240 Parametern. Mäuse beider Geschlechter durchlaufen einen Arbeitsplan, der die Analyse aller wichtigen Körpersysteme, sowie Aspekte der Pathologie und Genexpression, verteilt auf die jeweiligen spezialisierten Module/Screens, beinhaltet (**Abb. 2**). Alle Daten der insgesamt 20-wöchigen Analyse dienen zusammen der Evaluierung des Primärphänotyps, welcher dann in speziellen und detaillierten sekundären/tertiären Folgeuntersuchungen verifiziert werden kann. Darüber hinaus gewährleistet die standardisierte Durchführung aller Analysen eine valide Datenerfassung. Standardisierte Methoden bei der Handhabung und Haltung von Mäusen werden auf dem Gebiet der funktionellen Mausgenomik mittlerweile gefordert, da gezeigt worden ist, dass sogar kleine Änderungen im Arbeitsablauf biologische Werte verändern und dadurch die Reproduktion von Phänotypisierungsdaten gefährdet wird (Champy et al. 2004; Bailey et al. 2006).



**Abbildung 2: Der standardisierte Arbeitsplan des Primärscreens:** Die Analyse jeder Mauslinie beginnt im Alter von 8 Wochen im Verhaltensmodul und endet im Alter von 20 Wochen mit den pathologischen Untersuchungen. Schraffierte Flächen markieren auf Blutproben basierende Analysen. (<http://www.mouseclinic.de>)

### 1.3 Die Suche nach Verhaltensprofilen – Das Verhaltensmodul und die Endophänotypen

Im Kontext der GMC eingebettet, arbeitet das Verhaltensmodul mit dem Ziel, molekulare Signalwege, die bestimmten Verhaltensweisen zugrunde liegen, an Studien mit mutanten

Mauslinien aufzudecken. Darüber hinaus sollen Einsichten in genetische Faktoren, die an psychiatrischen Erkrankungen beteiligt sind, gewonnen werden (Tarantino and Bucan 2000; Bucan and Abel 2002; Tabor et al. 2002).

Die meisten psychiatrischen Erkrankungen stellen eine Kombination mehrerer Symptome dar, die in so genannte Endophänotypen untergliedert werden können. Endophänotypen sind das interne Verbindungsglied zwischen dem Genotyp und dem externen *Readout*, dem Verhaltens- bzw. klinischem Phänotyp (Gottesman and Gould 2003; Gould and Gottesman 2006). Endophänotypen können z.B. neurophysiologischer, biochemischer, endokrinologischer, kognitiver oder neuropsychologischer Natur sein (Leboyer et al. 1998). Dabei müssen sie bestimmten Voraussetzungen entsprechen: 1) der Endophänotyp wird mit einer Krankheit in der Population assoziiert, 2) der Endophänotyp ist vererbbar, 3) der Endophänotyp ist unabhängig vom Ist-Zustand im Individuum manifestiert, 4) innerhalb von Familien mendeln der Endophänotyp und die Krankheit zusammen und 5) der Endophänotyp wird in von der Krankheit betroffenen Familien bei nicht betroffenen Familienmitgliedern in einem höheren Maße angetroffen als bei der Durchschnittspopulation (Gottesman and Gould 2003; Gould and Gottesman 2006).

Da Verhaltensphänotypen auf komplexen genetischen Interaktionen beruhen, die zudem von der Umwelt deutlich mitgeprägt werden (Hamer 2002; Ohl and Keck 2003), können sie, wie auch psychiatrische Erkrankungen, in ihrer vollen Komplexität nicht innerhalb *eines* mutanten Mausmodells dargestellt werden.

Das verhält sich mit den Teilaspekten der Gesamtsymptomatik, den Endophänotypen, anders. Diese können in Mausmodellen dargestellt werden. Beispiele sind der Angstzustand bei Depressionen, nicht funktionierende Prepulsinhibition, sowie Defizite im Arbeitsgedächtnis bei Schizophrenie und soziale Defizite bei Autismus und Schizophrenie, ferner auch Hyperaktivität beim Aufmerksamkeits-Defizit-Syndrom (Seong et al. 2002; Gottesman and Gould 2003; Inoue and Lupski 2003; Heiser et al. 2004; Gould and Gottesman 2006). Damit stellen die Endophänotypen ein Konzept dar, mit dem komplexe Verhaltensbilder einer Krankheit zerlegt und analysiert werden können. Sie bieten darüber hinaus eine Annäherung an die genetische Komponente des Verhaltens.

Um im Rahmen der zeitlich engen und quantitativ hohen Durchlaufleistung des GMC-Primärscreens effizient potentielle Endophänotypen auf dem Gebiet des Verhaltens zu finden, bedarf es für den Verhaltensscreen einer Methode, die das Erfassen möglichst vieler

Verhaltensdimensionen zeitsparend, aber dennoch detailliert ermöglicht. Gewöhnlich basiert die Verhaltensphänotypisierung auf der Anwendung einer Testbatterie. Dabei durchlaufen die Mäuse der Reihe nach mehrere spezifische Tests, die jeweils ein enges Spektrum von Verhaltensmustern erfassen, u.a. Lokomotion, Angst- und Depressionsverhalten, Lern- und Gedächtnis-, sowie soziale Fähigkeiten, Gleichgewichts- oder Hörsinn (Crawley and Paylor 1997; Crawley 1999b; McIlwain et al. 2001; Takao and Miyakawa 2006). Die spezifischen Tests zusammen in einer Testanordnung evaluieren das Verhalten der Mäuse gründlich und sind unverzichtbar für eine fundierte Analyse. Allerdings erfordert eine Testbatterie viel Zeit und hohen personellen Aufwand, sowohl für die Durchführung als auch für die Analyse der einzelnen Ergebnisse und zur Evaluierung des Verhaltensrepertoirs der Mauslinie. Im Hinblick auf die Durchlaufleistung einer Einrichtung wie der GMC wäre eine Testbatterie im Verhaltensscreen zur Evaluierung eines potentiellen Endophänotyps mutanter Mauslinien beider Geschlechter logistisch ineffizient.

Im Jahre 2001 wurde von Ohl und Mitarbeitern ein Verhaltenstest entwickelt, welcher der Konzeption nach den Ansprüchen einer leistungsstarken primären Verhaltensphänotypisierung mit hohem Durchsatz durch Erfassung mehrerer Verhaltensdimensionen in einem einzigen Test entspricht (Ohl and Keck 2003) und daher im Verhaltensprimärscreen der GMC routinemäßig angewendet wird: Der modified Hole Board Test (mHB).

### **1.4 Unkonditioniertes Verhalten bei Nagern: Der modified Hole Board Test – Hintergrund, Testaufbau und Datenlage**

#### **Hintergrund**

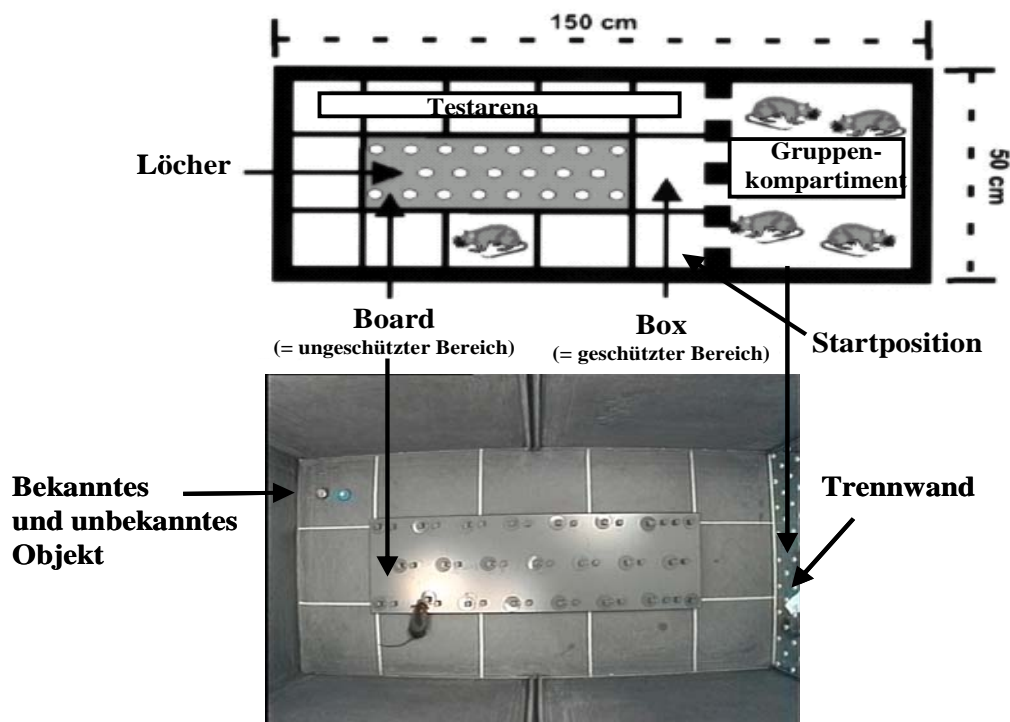
Der modified Hole Board (mHB) Test nach Ohl et al. (Ohl et al. 2001a; Ohl et al. 2001b) ermöglicht eine umfassende Analyse mehrerer Verhaltensdimensionen wie Lokomotion, Explorationsverhalten, Erregung, angstkorreliertes Verhalten, Gedächtnis und soziale Affinität bei Nagern in nur einem kurzen Test. Somit kann er die Nachteile einer Testbatterie innerhalb eines *high-throughput* Ansatzes kompensieren. Das mHB vereint die Charakteristika des *Hole-Boards* und des *Open Fields* (Ohl and Keck 2003). Ersteres misst das Explorationsverhalten von Ratten und Mäusen (File and Wardill 1975b; File and Wardill 1975a), letzteres dient in seiner Ursprungsversion von Hall der Evaluation des emotionalen

Verhaltens bei Ratten (Hall and Ballechey 1932; Hall 1934; Prut and Belzung 2003) und ist der Standardtest für Angstverhalten sowie Lokomotion (Crawley 1999a; Ohl and Keck 2003). Das von Ohl und Mitarbeitern 1998 (Ohl et al. 1998) modifizierte Hole Board zur Evaluierung der Kognition von Tupajás wurde anschließend für Nagetiere angepasst und auf das Erfassen zusätzlicher Verhaltensdimensionen erweitert (Ohl et al. 2001a; Ohl et al. 2001b; Ohl et al. 2001c). Dabei misst das mHB spontanes, nicht gelerntes, d.h. unconditioniertes Verhalten (Lister 1990) in unbekannter Umgebung.

### Testaufbau

Das mHB besteht aus zwei voneinander getrennten Bereichen (**Abb. 3**): Der Testarena und dem Gruppenkompartiment. In der Mitte der Testarena repräsentiert ein *Board* mit Löchern, die von beweglichen Kappen bedeckt werden, den ungeschützten Bereich eines *Open Fields*. Da Mäuse in unbekannter Umgebung zuerst geschütztes Areal, d.h. im mHB entlang der Wand (*Box*), erforschen, und erst dann die freien, ungeschützten Flächen (Lister 1990; Crawley 1999b), dient ihr Verhalten in Bezug auf das *Board* als Indikator für Angst. Dabei wird ermittelt wie oft (Anzahl) und wann (Latenz) sie das *Board* betreten bzw. wie viel Zeit (Dauer) sie auf dem *Board* verbringen. Der Bereich um das *Board* ist durch Linien in Quadrate geteilt. Die Linien dienen der Ermittlung der Lokomotion, der Aktivität des Testtieres. Da jedes Verhalten letzten Endes von der Bewegungsfähigkeit/Mobilität mitbestimmt wird, stellt die Lokomotion eine Verhaltensdimension dar, die alle anderen erhobenen Parameter mit beeinflussen kann und möglicherweise von ihnen nicht scharf zu trennen ist. Die allgemeine lokomotorische Aktivität kann im mHB als Anzahl der Linienübertritte (oder mit Hilfe eines Tracking-Systems, siehe 5.2.2) dargestellt werden. Die Exploration wird unterschieden in gerichtete/horizontale und ungerichtete/vertikale Exploration. Bei ersterer werden Strukturen durch Beschnüffeln und Tasten mit Tasthaaren erkundet, da das olfaktorische und somatosensorische System bei Mäusen sehr gut entwickelt ist und die Tasthaare als taktile Detektoren fungieren (Feldman and Brecht 2005; Muroi et al. 2006; Restivo et al. 2006). Gemessen wird die gerichtete Exploration anhand der Exploration der Löcher auf dem *Board* und der Erkundung des bekannten und unbekanntes Objektes (Dauer, Latenz und Anzahl). Über die Exploration hinaus dienen die Objekte im mHB als Indikatoren für die im Objekterkennungstest gemessene Gedächtnisleistung des Testtieres. Intensivere Exploration des bekannten im Vergleich zum unbekanntes Objekt wird als verminderte Gedächtnisleistung verstanden (Ennaceur and Delacour 1988; Bevins and Besheer 2006). Als Maß für die ungerichtete olfaktorische Investigation der Umgebung dient

die Anzahl des „sich auf die Hinterbeine Aufrichtens“ (*Rearing*), das man daher als vertikale Aktivität im Vergleich zur horizontalen ansehen kann (Prut and Belzung 2003). Des Weiteren ermöglicht das mHB die Abschätzung der sozialen Affinität des Testtieres, indem gemessen wird, wie oft und intensiv das Testtier olfaktorischen und visuellen Kontakt an der durchsichtigen Trennwand zu seinen Käfigmitgliedern sucht. Abgesehen davon, dass der mHB-Test diese Verhaltensdimension zu messen ermöglicht, haben Ohl und Mitarbeiter gezeigt, dass das Vorhandensein der sozialen Gruppe während des Tests den Stress des getesteten Tieres reduziert (Ohl et al. 2001a). Da Nagetiere nur in einer adäquaten Umwelt natürliches Verhalten zeigen können (Ohl and Keck 2003) bedeutet dieses, dass die Laborbedingungen an die natürlichen soweit wie möglich angeglichen werden sollten. Daher ist die Vermeidung von künstlichem Stress für die Testmaus positiv zu bewerten. Außerdem wird im mHB das „Sich-Selbst-Putzen“ (*Grooming*) gemessen, welches als Maß für physiologischen Erregungszustand angesehen wird (Ammassari-Teule et al. 1994; Choleris et al. 2001; Ohl et al. 2001a).



**Abbildung 3:** Arena für den modified Hole Board Test erstellt nach Ohl et al., 2001. Während des 5-minütigen Tests wird das unkonditionierte Verhalten der Testmaus in der Testarena ermittelt. Das Board dient als ungeschützter Bereich dem Messen von Angstverhalten sowie gerichteter Exploration der Löcher auf dem Board. Die Lokomotion kann z.B. anhand der Linienübertritte im geschützten Bereich gemessen werden. Die durchsichtige Trennwand zum Gruppenkompartiment erlaubt die Bestimmung der sozialen Affinität. Mit Hilfe der beiden Objekte, des bekannten und des unbekanntes, wird die Objekterkennung gemessen. Des Weiteren werden Erregungszustand anhand von *Grooming*-Verhalten und vertikale Exploration anhand von *Rearings* ermittelt.

## **Datenlage**

Anhand zweier Rattenstämme, die sich nach Zucht entweder durch extrem niedriges bzw. extrem hohes angstkorreliertes Verhalten unterschieden, haben Ohl und Mitarbeiter gezeigt, dass die Verhaltenscharakterisierung im mHB die gleichen Phänotypisierungsergebnisse lieferte (Ohl et al. 2001a), wie sie zuvor durch die Anwendung mehrerer Tests ermittelt wurden (Henniger et al. 2000). Weitere Untersuchungen mit Hilfe des mHBs zeigten, dass kognitive Prozesse dieser Rattenstämme nicht unabhängig von deren Angstverhalten sind. Die erhöhte Ängstlichkeit von naiven HAB Ratten (*High anxiety-related behavior*) wurde im Vergleich zu weniger ängstlichen naiven LAB Ratten (*Low anxiety-related behavior*) als Konsequenz unterschiedlicher kognitiver Verarbeitung interpretiert (Ohl et al. 2002).

Indem das bereits bekannte unkonditionierte Verhalten von männlichen C57BL/6N und BALB/cAnN - Mäusen zweier Inzuchtstämme - im mHB ebenfalls differenziert und ferner die angstlösende Wirkung von Diazepam ebenfalls in dieser Studie gezeigt wurde (Ohl et al. 2001b), war der mHB Test auch in Mäusen etabliert. Eine weitere mHB-Studie mit Mäusen, diesmal an C57BL/6J und DBA/2N, zeigte, dass beide Stämme sich bei gleicher lokomotorischer Aktivität in ihrem Angstverhalten unterschieden und daher als Mausmodell für angeborene Ängstlichkeit fungieren könnten (Ohl and Keck 2003). Auf der Suche nach interessanten Endophänotypen in Mäusen für psychische Erkrankungen wird der mHB Test am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München bereits routinemäßig als Ersttest für ENU-Mutanten eingesetzt (Ohl and Keck 2003).

Die Analyse männlicher C57BL/6N Mäusen mit und ohne Gelegenheit zur freiwilligen körperlichen Betätigung im Heimkäfig zeigte, dass sich Bewegung positiv auf das Verhalten auswirkte. Mäuse mit Zugang zum Laufrad zeigten im mHB, sowie in spezifischeren Tests, erniedrigtes angstkorreliertes Verhalten und erniedrigte Impulsivität, was als bessere Stressbewältigungsstrategie interpretiert werden kann (Binder et al. 2004).

Das mHB wird auch zur Identifikation von Funktionsmechanismen von Pharmaka auf Verhaltens-, sowie zellulärer und molekularer Ebene eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass der Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 1 Antagonist NBI30775 eine angstreduzierende Wirkung in männlichen DBA/2N Mäusen erzielt (Post et al. 2005). Ferner diente das mHB zur Untersuchung der Wirkung von Tag/Nachtrhythmen auf unkonditioniertes Verhalten bei männlichen DBA/2N Mäusen. Diese Studie zeigte, dass Testen während der Ruhephase der DBA/2N Mäuse deren Aktivitätslevels in den meisten Verhaltensdimensionen, sowie die kognitive Leistungsfähigkeit reduziert (Roedel et al. 2006).



## 1.5 Eigene Untersuchungen – Hintergrund, Zielsetzung und Konzepte

Die publizierten Studien zeigen, dass das mHB erfolgreich für Verhaltensstudien an Ratten, sowie Mäusen genutzt wird und sich für high-throughput Methoden eignet (Ohl and Keck 2003). Der Einsatz des mHBs auf der Suche nach Endophänotypen innerhalb des Verhaltensmoduls der GMC ist daher als Methode sinnvoll. Deshalb wurde ein mHB entsprechend den Anleitungen (Ohl et al. 2001a; Ohl et al. 2001b; Ohl et al. 2001c) gebaut und wird als Primärscreen im Verhaltensmodul benutzt. Dennoch bedeutet ein in einem Labor validierter und routinemäßig angewendeter Verhaltenstest nicht, dass dieser ohne weiteres valide Ergebnisse in einem anderen Labor liefert.

### Hintergrund

Die Bedingungen innerhalb eines Labors stellen für die Mäuse eine konstante, kontrollierte und standardisierte Umwelt dar. So werden physikalische Parameter wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Tag/Nachtrhythmus meist automatisch reguliert. Dennoch existieren innerhalb eines Labors zahlreiche Faktoren, die potentielle Quellen für Unterschiede in erhobenen Verhaltensdaten darstellen. So hängt die Reaktion eines Tieres auf seine Umwelt von seinem hierarchischen Rang innerhalb einer Sozialstruktur ab (Blanchard et al. 2001). So zeigen rangniedrigere, submissive männliche Mäuse vom B6J wie auch vom NMRI Stamm erhöhtes Angstverhalten (Avgustinovich et al. 1997; Keeney and Hogg 1999). Bei männlichen Swiss Mäusen wirkt der soziale Rang hingegen umgekehrt auf das Angstverhalten (Ferrari et al. 1998). Damit wird implizit auch deutlich, dass die genetische Variabilität, also der Stamm, Verhalten beeinflussen kann. Stammunterschiede der Mäuse beeinflussen beispielsweise assoziatives Lernen im *Fear Potentiated Startle* Test (Falls et al. 1997), Angstverhalten in der *Zero-Maze* (Tarantino et al. 2000), die Aktivitäts- und Habituationmuster im *Open Field* Paradigma (Bolivar et al. 2000; Bothe et al. 2005), spontanes Putzverhalten (*Grooming*) als Reaktion auf unbekannte Umwelt (Kalueff and Tuohimaa 2005). Ein weiterer Faktor, der nachweislich das Verhalten von Labormäusen beeinflussen kann, sind Haltungsbedingungen: BALB/c Mäuse, die unter *enriched* (verbesserten) Käfigbedingungen aufgezogen wurden, zeigten später weniger angstkorreliertes Verhalten als BALB/c, die unter *nicht-enriched* Bedingungen aufwuchsen (Chapillon et al. 1999). Eine breit angelegte Studie mit Männchen von vier Inzuchtstämmen und deren Analyse in acht Verhaltenstests kommt zu dem Ergebnis, dass Haltungsbedingungen auf die Tests sowohl stamm- als auch testspezifisch wirken (Tucci et al.

2006). Ferner können Haltungsbedingungen nicht nur die Mittelwerte einer beobachteten Gruppe, sondern auch ihre Variabilität beeinflussen: DBA/2 Mäuse unter *enriched*-Bedingungen weisen erhöhte Gruppenvariabilitäten im *Open Field* Test im Vergleich zu Kontrollen unter *nicht-enriched*-Bedingungen auf (Tsai et al. 2003b). Erhöhte Gruppenvariabilität bzw. erniedrigte Gruppenhomogenität könnte die Verhaltensphänotypisierung erschweren. Hingegen zeigt eine andere Studie an DBA/2 (sowie C57BL/6J Weibchen und deren F1-Hybriden), dass, obwohl die Mittelwerte variierten, die Gruppenvariabilitäten unter *enriched*-Bedingungen unverändert blieb (Wolfer et al. 2004). Da sich beide Studien hinsichtlich der Haltungsbedingungen wie auch der Durchführung voneinander unterschieden, hängen Verhaltensdaten auch von der Testkonzeption ab. McIlwain und Mitarbeiter haben gezeigt (McIlwain et al. 2001), dass Test naive männliche C57BL/6J je nach Test im Vergleich zu Test erfahrenen aktiver, weniger aktiv oder von ihnen nicht zu unterscheiden waren und dass die Reihenfolge der Tests das Verhalten ebenfalls beeinflusst. Das Testintervall einer feststehenden Testbatterie hingegen scheint sich auf Verhaltensdaten nicht auszuwirken (Paylor et al. 2006). Noch diffiziler wird es, wenn man bedenkt, dass das Geschlecht ebenfalls ein Faktor ist, der in die angestellten Betrachtungen einbezogen werden muss (Terranova et al. 1993; Bolivar et al. 2000; Tarantino et al. 2000; Tsai et al. 2003b). All die genannten sowie weitere Faktoren wie Testausstattung, Lichtintensität, Tag/Nachtrhythmus usw. (Trullas and Skolnick 1993; Fernandes and File 1996; Hogg 1996; Kopp et al. 1998; Roedel et al. 2006) können Verhaltensphänotypisierungen beeinflussen.

All dies zeigt, dass das Erheben von identischen Absolutwerten bei Verhaltensdaten aufgrund vieler Faktoren, die innerhalb wie auch zwischen den Laboren variieren, erschwert ist. Abgesehen von der Tatsache, dass die Schaffung von gleichen, standardisierten Laboreinrichtungen utopisch ist (Wahlsten 2001), ergeben sich auch bei der größtmöglichen Standardisierung zwischen mehreren Laboren dennoch Unterschiede in Absolutwerten von Verhaltensergebnissen (Crabbe et al. 1999). Sind Phänotypisierungsergebnisse folglich schwer reproduzierbar?

Der Phänotyp ist ein komplexes Erscheinungsbild, das sich aus der Kombination seines Genotyps und seiner Umwelt sowie im Falle der genmanipulierten Maus des Weiteren in Abhängigkeit vom Hintergrundstamm und Testgeschichte ergibt (Hamer 2002; Brown et al.

2006). Somit sind Absolutwerte sicherlich als schwer reproduzierbar einzustufen. Ein Phänotyp wird aber in Relation zu der gewählten Kontrolle beschrieben. Im Falle z.B. einer mutanten Mauslinie sind die korrekten Kontrollen Mäuse aus dem gleichen Wurf ohne die Mutation (Crawley 1999b; Bailey et al. 2006) und, wenn die Mutation auf einem reinen Inzuchtstammhintergrund ist, auch der relevante Hintergrundstamm (Brown et al. 2006) unter Beachtung gleicher Haltungs- und Testgeschichte. Definiert man erfolgreiche Reproduktion von Phänotypen ohne Fokus auf Absolutwerte als Ziehen gleicher Schlüsse aus Untersuchungen, bei denen bestimmte Faktoren konstant gehalten wurden, dann ist valide Phänotypisierung über die Grenzen des eigenen Labors realistisch (Lewejohann et al. 2006).

Um valide Verhaltensphänotypisierungen innerhalb eines Labors oder zwischen unterschiedlichen Laboren zu erzielen, kann man sich standardisierter Verhaltensprotokolle bedienen. Solche SOPs (= standardized operating procedures) wurden z.B. im Rahmen des EUMORPHIA Projektes von Wissenschaftlern aus ganz Europa erarbeitet, verifiziert und validiert und sind öffentlich zugänglich (<http://www.eumorphia.org/EMPRESS/>) (Brown et al. 2005). Dort findet man nicht nur SOPs für Verhaltensanalysen, sondern auch für andere Körpersysteme, denn die angesprochenen Faktoren beeinflussen nicht nur Verhaltensparameter (Nagy et al. 2002; Tsai et al. 2002; Tsai et al. 2003b; Champy et al. 2004; Pasche et al. 2005; Klempt et al. 2006).

Diese Datenlage zeigt in Bezug auf die Einführung des mHB als Verhaltensprimärscreen in der GMC, wie wichtig und notwendig es ist, einen Verhaltenstest und mögliche ihn beeinflussenden Faktoren im eigenen Hause bewerten zu können.

### **Zielsetzung**

Ziel dieser Doktorarbeit war, das mHB im Verhaltensmodul der GMC zu validieren. Das beinhaltete: (1) eine Untersuchung der Wirkung des mHB-Testsystems auf die Verhaltensprofile (*Baselines*) der Mäuse von Inzuchtstämmen, (2) Erfassen der Auswirkung der GMC-Haltungsbedingungen auf diese *Baselines* sowie Überprüfung, ob mögliche Effekte testspezifisch sind und (3) Evaluierung der Nützlichkeit des mHBs innerhalb des Primärscreens bezüglich (a) Bestätigung bekannter und (b) Detektion neuer Phänotypen im mHB bei mutanten Linien/Stämmen wobei exemplarisch an einer mutanten Linie über den Primärscreen auch die Folgeuntersuchungen detailliert dargestellt werden (c).

Abschließend sollte anhand der eigenen Datenlage beurteilt werden, ob der mHB Test valide Daten liefern und damit erfolgreich im Verhaltensscreen etabliert werden konnte.

## **Konzepte**

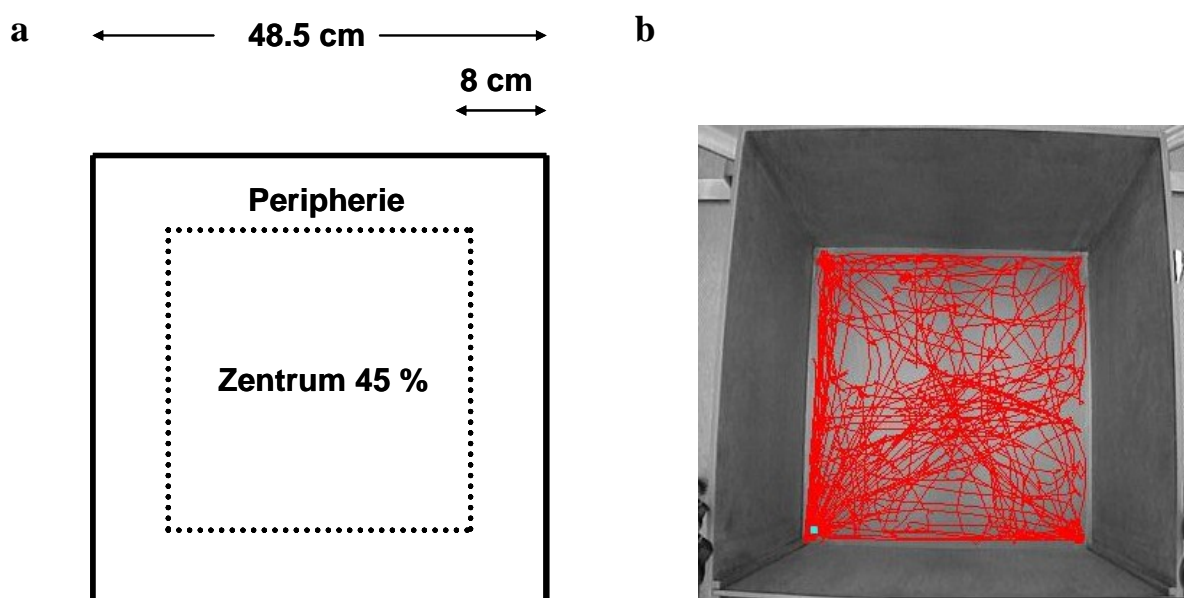
### **1.5.1 Teil 1: Validierung des modified Hole Boards**

Im ersten Schritt wurde das mHB Paradigma mit einem anderen Test für unkonditioniertes Verhalten bei Nagern, dem *Open Field* Paradigma, verglichen, da der *Open Field* Test das älteste, einfachste und das meist benutzte Verfahren darstellt, um Lokomotion und Angstverhalten bei Nagetieren zu messen (Crawley 1999a).

Das *Open Field* als eine runde und hell beleuchtete Arena mit Wand wurde in den 30`er Jahren des letzten Jahrhunderts von Hall als Messinstrument zum Erfassen von unkonditioniertem Angstverhalten bei Ratten eingeführt (Hall 1934). Über die Jahrzehnte existieren nun unterschiedliche Versionen hinsichtlich der Größe, Form, Ausleuchtung, Testdauer und Präsenz von Objekten in der Arena (Prut and Belzung 2003). Erfasst werden im *Open Field* teilweise die gleichen Verhaltensdimensionen wie im mHB: für gewöhnlich Lokomotion/Aktivität und, da die Tiere spontan die Peripherie im Vergleich zur offenen Fläche der neuen Umgebung bevorzugen, das Angstverhalten gemessen anhand der Aktivität/Zeit im Zentrum (Crawley 1999b; Prut and Belzung 2003). Dabei misst man in beiden Tests in den ersten fünf Minuten das unkonditionierte Verhalten der Maus als Reaktion auf die neue Umgebung, danach Habituationseffekte (Bailey et al. 2006). Zwar bietet das mHB mehrere Verhaltensdimensionen in einem Test, dafür ist das *Open Field* im Vergleich zum mHB relativ leicht zu automatisieren, es kann auf einen trainierten Beobachter eher verzichtet werden, was einen höheren Testdurchsatz erlaubt. Darüber hinaus ist das Verhalten von Mausinzuchtstämmen im *Open Field* bereits extensiv beschrieben (DeFries et al. 1978; Crabbe 1986; Hölter et al. 2004; Bothe et al. 2005), die Effekte putativer angstlösender Medikamente an Mäusen wurden intensiv im *Open Field* studiert (Prut and Belzung 2003; Volke et al. 2003; de Melo et al. 2006), das *Open Field* wird erfolgreich zur Phänotypisierung von Mausmutanten, z.T. innerhalb einer Testbatterie, eingesetzt (Rubinstein et al. 1997; Timpl et al. 1998; Miyakawa et al. 2001; Metz and Schwab 2004; Apostolova et al. 2006) und ist fester Bestandteil der Verhaltensphänotypisierung im europaweiten

Großprojekt Eumodic (The European Disease Mouse Clinic, <http://www.eumodic.eu/partners>).

Beide Tests messen Lokomotions- und Angstverhalten, aber es bestehen extreme konzeptionelle Unterschiede zwischen ihnen, die Auswirkungen auf das Verhalten der Mäuse haben könnten. In einem *Open Field* (OF), wie es dem standardisierten EMPRESS Protokoll entspricht (<http://www.eumorphia.org/EMPRESS/>), beträgt das Zentrum 45% der Gesamtfläche des OF (**Abb. 4**). Der Übergang zwischen Peripherie und Zentrum ist für die Maus physisch nicht detektierbar, da die Fläche des Bodens (und der Wände) unstrukturiert ist. Ferner sind keine Gegenstände zum Explorieren im OF platziert und die Maus wird von der Gruppe isoliert direkt vom Heimkäfig in die Testarena gesetzt. Im mHB hingegen beträgt das Zentrum 24% der Gesamtfläche. Hier ist das Zentrum für die Maus physisch detektierbar, da es durch das *Board* repräsentiert wird. Zudem ist im mHB die Peripherie durch Linien unterteilt, es gibt Objekte, Löcher und das anschließende Gruppenkompartiment zum Explorieren. Vor dem Test wird die Maus im Gruppenkompartiment habituiert. Von den Ausmaßen ist die Testarena des mHBs doppelt so groß wie im *Open Fields*, die Zentrumfläche entspricht mit absoluten 1200 cm<sup>2</sup> knapp der des Zentrums des *Open Fields* mit ca. 1056 cm<sup>2</sup> (bei einer Gesamtgröße von 48.5 x 48.5 cm).



**Abbildung 4:** Der *Open Field* Test: (a) virtuelle Teilung der Arena in die periphere Zone und das Zentrum (45 % der Gesamtfläche), (b) das verwendete *Open Field* aus grauem PVC mit vom Tracking-System Ethovision 2.3 (Noldus, Wageningen, NL) aufgezeichnetem gelaufenen Weg einer Maus.

Ziel des Vergleiches vom mHB zum *Open Field* Test bezüglich potentieller Unterschiede der Lokomotions- und angstkorrelierten Parametern bei Mäusen war es, *Baselines* aus beiden Tests miteinander vergleichen zu können. Des Weiteren wurde im mHB-System der Einfluss der physikalischen Struktur des *Boards* auf eben diese Parameter untersucht, indem Lokomotions- und angstkorrelierte Parameter von Mäusen im mHB mit und ohne *Board* bei ansonsten gleichen Testbedingungen analysiert wurden. Aufgrund dieser Versuchsansätze sollte das mHB-Testsystem besser beurteilt werden können.

Um die *Baselines* in beiden Tests zu messen sowie für alle weiteren Grundlagenuntersuchungen wurden Mäuse vom C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6J) Inzuchtstamm gewählt, da diese für Mutagenesestudien in den „*phenotype-*“ wie auch „*gene-driven*“ Ansätzen verwendet werden (Hrabe de Angelis et al. 2000; Nolan et al. 2000; Banbury Conference, 1997). Sie sind die Hintergrundstämme der meisten Mauslinien, die im GMC analysiert werden, und bisher lagen noch keine Daten von diesen Stämmen im mHB vor. Zudem wurden Mäuse beider Geschlechter untersucht, da sich Phänotypen, Reaktionen auf Medikament verabreichung, sowie Krankheitsbilder in Abhängigkeit vom Geschlecht unterscheiden können, sowohl beim Menschen als auch der Maus (Mogil et al. 1997; Peirce et al. 1998; Kornstein et al. 2000a; Kornstein et al. 2000b; Tarantino et al. 2000; Wiesenfeld-Hallin 2005; Cahill 2006; Hankin et al. 2007; McCarthy 2007).

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Blindheit auf unkonditioniertes Verhalten im mHB untersucht. C3HeB/FeJ Mäuse beider Geschlechter erblinden im Alter von einem bis zwei Monaten aufgrund einer retinalen Degeneration, die auf eine Mutation im Gen *Pde6b* zurückzuführen ist (Chang et al. 2002). Da Verhalten von der Verarbeitung sensorischer Reize mit abhängt, ist es wichtig beurteilen zu können, inwieweit bei bestimmten Verhaltenstests intakte Sehfähigkeiten eine Rolle spielen. So zeigen nur sehende *Pde6b+* Mäuse auf C3H Hintergrund intaktes Lernverhalten im räumlich-visuellen Morris Water Maze Test, während Kontext bezogenes Lernen im Fear Conditioning von der Sehfähigkeit nicht beeinflusst wird (Clapcote et al. 2005).

Um den Einfluss der Blindheit bei C3H beider Geschlechter auf die mHB-Performance zu untersuchen, wurde das unkonditionierte Verhalten von blinden C3H mit dem von sehenden C3H (C3H.*Pde6b+*) verglichen. Diese sehende C3H Linie trägt durch Kreuzung mit BALB/c sowie anschließender Rückkreuzung über mehrere Generationen deren intaktes *Pde6b* Gen (Wildtyp) auf beiden Allelen (Thaug et al. 2002; Hart et al. 2005). Die sehenden C3H der

vorliegenden Arbeit waren auf C3H/HeH Hintergrund gezüchtet worden, daher diente hier als Kontrolle der blinde C3H/HeH Unterstamm.

### **1.5.2 Teil 2: Einfluss von IVC-Käfighaltung**

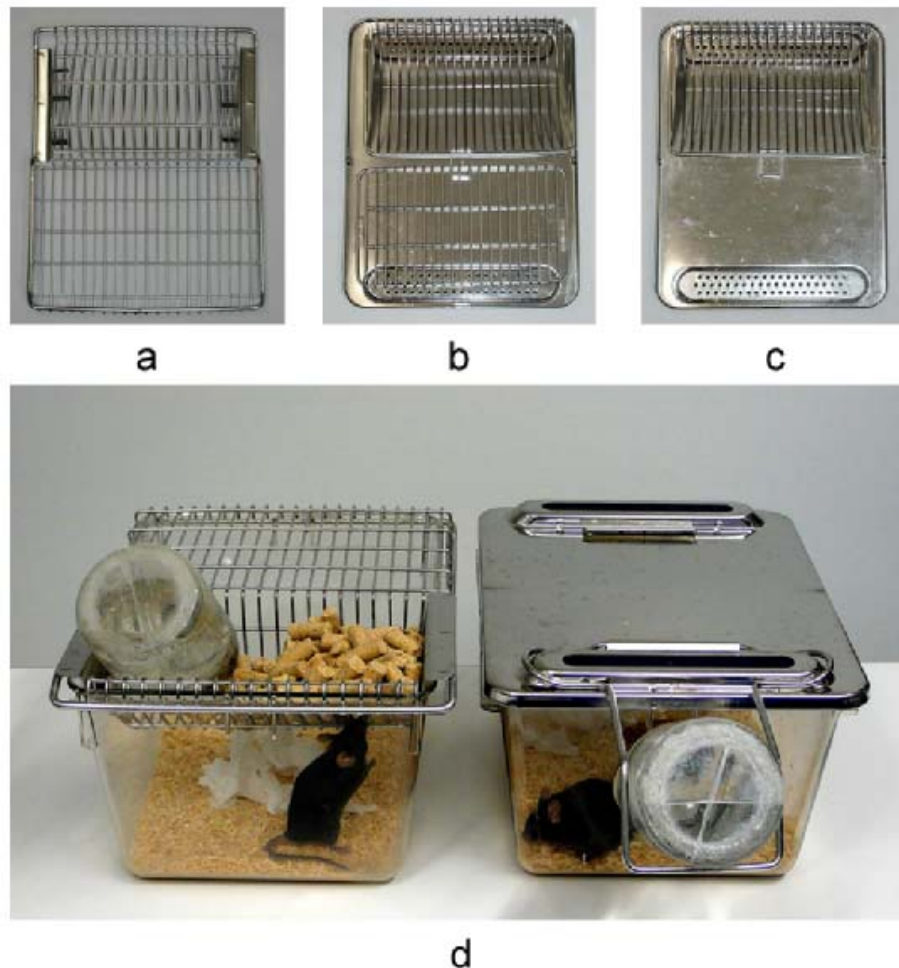
Da die GMC als offene Phänotypisierungseinheit eingerichtet wurde und somit Mauslinien mit unterschiedlichem Gesundheitsstatus in die GMC importiert und dort gleichzeitig untersucht werden, müssen optimale hygienische Standards gewährleistet sein. Um das Ausbreiten von Infektionen so weit wie möglich zu verhindern, werden einzeln belüftete Käfige - Individually Ventilated Cages (IVC) - als Haltungsbedingungen für die Mäuse verwendet.

Zwar ist bekannt, dass Haltungsbedingungen physiologische und Verhaltensparameter von Mäusen beeinflussen können (siehe oben und (Terranova et al. 1993; Crabbe et al. 1999; Wolfer et al. 2004)), dennoch werden Details der Labortierhaltung als potentielle Quelle möglicher Differenzen in Ergebnissen zwischen Laboren (Wahlsten 2001) nicht regulär berichtet und untersucht. Da die Verwendung von IVCs relativ neu ist, aber bei steigender Anzahl von Phänotypisierungszentren mit Hochdurchsatz die Methode der Wahl werden könnte, ist es wichtig zu untersuchen, ob die IVC-Haltung im Vergleich zu konventioneller Käfighaltung einen Einfluss auf Verhaltensdaten hat.

Bis heute wurden die Effekte von IVC Haltung nur im Hinblick auf Zuchteinfluss, Gesundheitsstatus aufgrund unterschiedlicher Ventilisationsraten und Häufigkeit der Käfigwechsel, Kohlendioxidkonzentrationen im Käfig bei Ausfall der Lüftung und die Exposition gegenüber Allergenen untersucht (Hoglund and Renstrom 2001; Reeb-Whitaker et al. 2001; Renstrom et al. 2001; Krohn and Hansen 2002; Tsai et al. 2003a). Daher war es das Ziel dieses Teils der Arbeit, die Effekte von konventioneller Haltung und IVC Haltung im Hinblick auf Verhalten von Mäusen zweier Inzuchtstämme im mHB zu untersuchen.

Aufgrund des soliden rostfreien Stahldeckels von IVC-Käfigen sind Mäuse, die in der GMC in IVCs gehalten werden, weniger stark den externen Umwelteinflüssen ausgesetzt als Mäuse in konventionellen Käfigen. Zudem sind diese IVC-Deckel glatt und nur mit einer kleinen gitterähnlichen Futterraufe ausgestattet (**Abb. 5c**), wohingegen der Deckel von konventionellen Käfigen komplett aus einem Gitter besteht (**Abb. 5a**). Somit haben Mäuse in IVC-Käfigen weniger Kletterfläche als Mäuse in konventioneller Haltung. Um zu

untersuchen, ob potentielle Unterschiede der Testergebnisse eine Konsequenz unterschiedlicher Klettermöglichkeiten sein könnten, wurden zusätzlich IVC-Deckel modifiziert, indem auf die Deckelinnenseite der Stahlfläche extra Gitter („grid“) angebracht wurden (**Abb. 5b**).



**Abbildung 5:** Fotos von der Unterseite der drei unterschiedlichen Deckel für Typ II Macrolon® Käfige, wie sie in der konventionellen Haltung (a) und für Haltung in so genannten *individual ventilated cages* (IVCs; b, c) in dieser Arbeit verwendet wurden (**Ansicht der Innenseite**). Die Futterbehälter sind in der oberen Hälfte der Deckel angebracht. a) „Conventional“, Deckel aus Metallgitterstäben; b) „IVC grid“, Standard massiver Biozone™ IVC Deckel wie in c), aber mit individuell gefertigtem rechteckigen Metallgitter („Gitterrost“), an die Unterseite des Innendeckels geschweißt, die glatte Oberfläche bedeckend; c) „IVC classic“, Standard massiver Biozone™ IVC Deckel mit glatter, unstrukturierter Unterseite wie vom Hersteller geliefert. Die Lochung im abgerundeten rechteckigen Feld in den oberen und unteren Bereichen der Deckel in b) und c) dient der Ventilation der IVCs. (d) Eine einzeln gehaltene Maus (C57BL/6J) in einem konventionellen Käfig (links) und einem IVC Käfig (rechts).



Erhoben wurden Daten für Männchen der C3HeB/FeJ und C57BL/6J Inzuchtstämme, die in konventioneller Haltung, IVC grid oder IVC classic Haltung gehalten wurden. Um einen Einfluss des Ranges auf die Ergebnisse auszuschließen, wurden die Männchen einzeln gehalten. Zusätzlich wurden nach dem mHB weitere Verhaltenstests durchgeführt, um beurteilen zu können, ob ein möglicher Effekt der IVC-Haltungsbedingungen testspezifisch sei. So wurde zusätzlich sensorimotorisches Verhalten mittels des akustischen Schreckreflexes gemessen (*Acoustic Startle Reflex* - ASR), da dieser effektiv in der Aufklärung genetischer Effekte auf neurale Mechanismen des Schreckreflexes angewandt wird (Davis 1980; Crawley 1999b; Plappert and Pilz 2001). Kognitive Fähigkeiten wurden mittels der Verstärkung des Schreckreflexes durch konditionierte Furcht (*Fear Potentiated Startle* = FPS) ermittelt. Der FPS Test ist ein kurzer, automatisierter Test, der konditionierte Angst in Mäusen messen kann (Falls et al. 1997; Falls 2002).

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob beobachtete IVC-Effekte auf unkontingiertes Verhalten (mHB) einzelgehaltener Männchen auch bei Gruppenhaltung zu sehen war. Hierbei wurden auch Weibchen beider Stämme untersucht, da Gruppenhaltung und Analyse von Mäusen beider Geschlechter Standard in der GMC sind. Aus Platzgründen in den Käfig-Racks wurde hier auf die IVC grid Käfighaltung verzichtet.

### **1.5.3 Teil 3: Nützlichkeit des mHB als Primärscreen in der German Mouse Clinic**

Das mHB wird in der GMC seit 2003 als Verhaltensprimärscreen verwendet. Dabei wird laut Arbeitsplan der GMC alle zwei Wochen eine neue Mauslinie analysiert. Im Idealfall stehen pro Mauslinie 30 Männchen und 30 Weibchen, von denen jeweils die Hälfte Mutanten und die andere Hälfte Wildtyp-Kontrollen aus gleichem Wurf sind, für eine Analyse zur Verfügung. Dabei werden in der ersten Woche die Männchen, in der zweiten die Weibchen analysiert.

#### **Analyse bereits bekannter Verhaltensphänotypen**

Ein weiterer Schritt, das mHB innerhalb des Verhaltensmoduls zu evaluieren war, schon publizierte, d.h. bekannte Verhaltensphänotypen auch im mHB zu analysieren. Die Resultate sollten dann Aufschluss darüber geben, ob das mHB im Verhaltensmodul sensitiv genug eingerichtet worden ist, um die gleichen Verhaltensphänotypen detektieren zu können. Dazu

wurden der Inzuchstamm PWD/Ph und die mutante Mauslinie CRHR1 knockout auf unconditioniertes Verhalten *reanalysiert*.

Der PWD/Ph Stamm ist ein Mausstamm, der eine Inzuchtlinie der Unterspezies *Mus Musculus Musculus* darstellt, wohingegen die meisten Labormäuse von *Mus Musculus Domesticus* abstammen (Beck et al. 2000). Die Vorfahren von *Mus Musculus Musculus* und *Mus Musculus Domesticus* separierten vor etwa einer Million Jahren voneinander. Damit ist dieser Stamm im Vergleich zu den domestizierten interessant im Hinblick auf die Analyse von komplexen Merkmalen, die trotz Domestizierung konserviert blieben wie das Defensivverhalten, während andere abgeschwächt wurden (Blanchard et al. 1998). Seit dem Einfangen von PWD/Ph in der Tschechischen Republik ist dieser Stamm nun seit mehr als 70 Generationen über Geschwisterverpaarungen genetisch isogen gezüchtet worden. Momentan entstehen durch die Kreuzung von wilden mit Labormäusen so genannte *Consomics*, bei denen je ein Chromosom vom anderen Stamm eingekreuzt worden ist, d.h. eine Chromosomensubstitution stattfand, und die als Analysewerkzeug für die Genetik des Verhaltens dienen könnten (Gregorova and Forejt 2000; Nadeau et al. 2000). Hinsichtlich ihres Verhaltens sind männliche PWD/Ph mit männlichen C57BL/6J verglichen worden, da diese Stammväter der *Consomics* darstellen. PWD/Ph Männchen sind aufgrund weniger Eintritte in das Zentrum des *Open Field Test* als ängstlicher, aber explorativer hinsichtlich neuer Objekte im Vergleich zu C57BL/6J beschrieben worden. Keinerlei Unterschiede ergaben sich im räumlich-visuellen Morris Water Maze Test als Maß für kognitive Leistungen (Fernandes et al. 2004). Zudem zeigen PWD/Ph erhöhtes *Grooming*-Verhalten und mehr *jump-escapes*, Sprünge, die als Fluchtreaktion (Blanchard et al. 1998) oder als Exploration der Fluchtmöglichkeiten (Holmes et al. 2000) interpretiert worden sind.

Die hier verwendete mutante Mauslinie CRHR1 ko ist eine Mauslinie, bei der durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen gezielt die kodierenden Sequenzen für die transmembranen Regionen V bis VII im Gen *crhr1*, kodierend für den Rezeptor 1 des Corticotropinfreisetzungshormons (CRHR1), fehlen (Timpl et al. 1998). Für dieses Gen homozygote mutante Mäuse (CRHR1 *-/-*) exprimieren einen funktionsunfähigen Rezeptor im Gegensatz zu den homozygoten Kontrollen, die auf beiden Allelen ein intaktes Gen tragen (CRHR 1 *+/+*). CRH ist ein Neuropeptid, das in der Adenohypophyse die Sekretion von Corticotropin (ACTH) via CRHR1 fördert und damit der wesentliche Mittler bei durch Stress

induzierter Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse (Vale et al. 1981; Holsboer et al. 1992; De Souza 1995; Deussing and Wurst 2005). ACTH seinerseits stimuliert anschließend die Ausschüttung des Steroidhormons Corticosteron aus der Nebennierenrinde. Im Vergleich zu Kontrollen weisen CRHR1  $-/-$  Mäuse nach einer Stresssituation niedrigere ACTH und Corticosteron Konzentrationen im Blut auf, und haben somit einen gestörte Hypothalamus-Hypophysen-Achse (Timpl et al. 1998). Ferner zeigen mutante CRHR1 erhöhte lokomotorische Aktivität im *Open Field* und explorieren das helle Kompartiment der *Light Dark Box*, einem Test für Angstverhalten (s. 5.2.5), früher, häufiger und länger, was als erniedrigtes angstkorreliertes Verhalten der Mutanten gegen Kontrollen interpretiert worden ist. Eine zweite existierende CRHR1 knockout Linie zeigt bei unterschiedlicher Strategie des Ziel-Konstrukts für den knockout gleiche Blut- und Verhaltensanalysen (Smith et al. 1998) wie sie bei der Mauslinie von Timpl et al. gefunden worden sind.

Damit ist der CRHR1 ko Phänotyp äußerst robust und sollte im mHB detektiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse zuerst in der *Light Dark Box* getestet, um den Phänotyp der Mauslinie von Timpl et al. direkt zu reproduzieren, erst anschließend folgte die Analyse im mHB. Da aus der Originalarbeit von Timpl et al. nicht klar hervorgeht, ob die *Light Dark Box* Daten gepoolte Ergebnisse beider Geschlechter oder nur eines Geschlechtes darstellen, in der vorliegenden Arbeit aber beide Geschlechter untersucht wurden, sind hier die *Light Dark Box* Daten in Anlehnung an die Originalarbeit nicht nach Geschlechtern getrennt ausgewertet worden. Dabei war bewusst, dass für beide hier getesteten Geschlechter der CRHR1 ko Mauslinien unterschiedliche Haltungsbedingungen und Vorerfahrungen herrschten (s. 5.3.3.1), was die Ergebnisse beeinflusst haben könnten. Aber Unterschiede in Haltung und Testkonzeption existierten an sich schon im Vergleich zur Originalarbeit. Daher war die Frage hier, ob trotz dieser grundlegenden Unterschiede zur Originalarbeit mit zusätzlich den Haltungs- und Vorerfahrungsunterschieden im eigenen Labor die Auswertung zur gleichen Schlussfolgerung bezüglich des *Light Dark Box* Phänotyps führte.

### **Effizienz des mHBs im Primärscreen – mutante Mauslinien innerhalb des GMC-Workflows**

Um die Effizienz der primären Phänotypendetektion im mHB zu bestimmen, wurden des Weiteren 62 mHB-Analysen unterschiedlicher Mauslinien des GMC-Verhaltensprimärscreens statistisch zusammengefasst. Dabei wurde quantitativ ausgewertet, wie viele Linien

signifikante Änderungen in den mHB-Parametern aufweisen. Hier wurde unterteilt in (1) die Anzahl der Linien mit subtil Änderungen der mHB-Parametern, d.h. die einzelnen signifikanten Änderungen ergaben zusammen keine Änderung in mindestens einer Verhaltensdimension, oder (2) Anzahl der Linien mit einem Phänotyp, d.h. hier ergaben die signifikanten Änderungen der mHB-Parameter zusammen mindestens eine veränderte Verhaltensdimension. Ferner stellte sich die Frage, wie viele Phänotypen sich geschlechtsspezifisch äußerten. Und schließlich, wie viele der angegebenen Phänotypen reine Verhaltensphänotypen darstellen und für weitergehende/sekundäre verhaltensbiologische Untersuchungen interessant erschienen bzw. wie viele der angegebenen Phänotypen eine Folge anderweitiger Ausprägungen der Genmanipulation darstellten, wie z.B. Alternation der Lokomotion aufgrund morphologischer Veränderung der Extremitäten.

Darüber hinaus wurden die Mauslinien qualitativ in *Phänotypenklassen* hinsichtlich vorwärts gerichteter Lokomotion, vertikaler Exploration, Aktivitätslevel, Exploration, Angst-, *Grooming*- und Sozialverhalten sowie Objekterkennung geordnet. Damit sollte quantitativ erfasst werden, welche Verhaltensdimension wie häufig einen Phänotyp im mHB stellte. Allerdings trug diese Klassifizierung der Tatsache nicht Rechnung, dass Änderungen in nicht nur einer Verhaltensdimension möglich waren. Aus der oben genannten Phänotypenklassifikation folgte, dass Mauslinien mit Veränderung z.B. in Lokomotions- und Angstparametern einer der beiden Phänotypenklassen zugeordnet wurden. Dabei wurde diejenige Phänotypenklasse gewählt, die für am wahrscheinlichsten befunden worden ist, in Nachfolgeuntersuchungen bestätigt werden zu können. Die Nachfolgeuntersuchungen *per se* dienen der Evaluation des gefundenen Phänotyps und gegebenenfalls auch der Dissoziation der im mHB gefundenen Phänotyp(en) einer Mauslinie. Hier werden die Mauslinien speziell auf jene Verhaltensdimensionen, die im mHB Veränderungen anzeigten, in spezifischeren Tests analysiert. Diese Untersuchungen gehen über das mHB hinaus und werden daher in dieser Arbeit für alle im mHB erfassten Linien nicht näher erläutert.

Auch wurde die prozentuale Verteilung der Mutations-Techniken in mutanten Mauslinien ohne Phänotyp im mHB mit der entsprechenden prozentualen Verteilung im Gesamtpool der untersuchten Mutanten verglichen. Damit sollte festgestellt werden, ob sich das Verteilungsmuster der Mutationstechniken aller untersuchten Mutanten in den Mutanten ohne Phänotyp widerspiegelt. Je exakter die prozentualen Verteilungen sich gleichen, desto unwahrscheinlicher, dass das mHB nur Phänotypen in Mäusen bestimmter Mutations-Techniken detektiert.

## Vom Primär- zum Sekundär-/Tertiärscreen: Verhaltensanalyse der Gene-Trap Mauslinie W04406 (Neurochondrin)

Eine der für weiterführende Verhaltensanalysen interessanten Mauslinien, die aus dem Verhaltensprimärscreen resultierte, war die Gene-Trap Mauslinie W044B06 (Neurochondrin).

Das Protein Neurochondrin (*Ncdn*) wurde 1997 identifiziert und ist gehirnspezifisch ubiquitär exprimiert, so u.a. im Olfactory Bulb, Amygdala, Hippocampus, Cerebellum und den Purkinje Zellen, daneben zeigen Chondrozyten, Osteoblasten und Osteozyten der Maus ebenfalls Neurochondrin-Expression (Ishizuka et al. 1999; Istvánffy et al. 2004). Es ist bekannt, dass Norbin – das Homolog zu Neurochondrin bei Ratten - neuronales Auswachsen induziert. Vermutlich spielt Norbin (Neurochondrin) eine wichtige Rolle bei der Ausprägung neuronaler Plastizität (Shinozaki et al. 1997). Da die Null-Mutante embryonal letal ist, stellt Neurochondrin wahrscheinlich ein für die Embryogenese wichtiges Protein dar (Mochizuki et al. 2003). Neben der Null-Mutante existiert eine weitere Neurochondrin Mutante, die innerhalb des German Gene Trap Consortiums (GGTC; <http://www.genetrap.de/>) hergestellt worden ist. Hier wurde im Klon W044B06 das Gen *ncdn* mit dem Gene-Trap Vektor pT1 $\beta$ *geo* eingefangen. Die zufällige Integration des Vektors führte zu einem Neurochondrin-Protein, dessen C-Terminus fehlt und das daher ein hypomorphes Protein darstellt (Maruyama, Istvánffy, nicht publiziert). Diese Mauslinie wurde aufgrund der starken Expression von Neurochondrin im Gehirn, was impliziert, dass diesem Protein eine wichtige Funktion im Verhalten zukommen könnte, 2003 im Verhaltensprimärscreen erstmals untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass geschlechtsspezifisch gruppengehaltene weibliche *Ncdn*  $-/-$  Mäuse bei normalem Aktivitätsniveau (Lokomotion) erhöhtes angstkorreliertes Verhalten (weniger Eintritte auf das *Board*, weniger Zeit auf dem *Board*), aber auch erhöhte soziale Affinität (Zeit im sozialen Kontakt) im Vergleich zu *Ncdn*  $+/+$  Weibchen zeigten (siehe GMC Abschlussbericht über Neurochondrin 2004).

Seit 2005 existiert auch eine Mauslinie, bei der Neurochondrin spezifisch im neuronalen Gewebe ausgeschaltet worden ist (Dateki et al. 2005). Diese Mutanten zeigen ein schlechteres Lernverhalten im räumlich-visuellen Morris Water Maze Test im Vergleich zu den Kontrollen, was eine Rolle von Neurochondrin bei räumlich-visuellem Lernen impliziert.

Basierend auf den Ergebnissen des Verhaltens der Gene-Trap Mutante Neurochondrin wurde ihre Verhaltensanalyse im Rahmen dieser Arbeit fortgeführt. Dabei sollte nach erfolgreicher Reproduktion der Primärphänotypisierung im mHB vorrangig geklärt werden, ob die

gesteigerten Werte in den Angstparametern einem Angstphänotyp zugrunde liegen und der erhöhte Sozialkontakt eine Folge davon ist. Oder aber, ob bei den Neurochondrin Mutanten ein Sozialverhalten-Phänotyp vorliegt, der im mHB sekundär die Angstparameter beeinflusste.

Um die beiden Verhaltensdimensionen Sozialverhalten und Angstverhalten besser dissoziieren zu können, wurde die Mauslinie in spezifischeren Angsttests (*Elevated Plus Maze*, *Light Dark Box*, *Social Interaction*, s. 5.2.4 ff) auf einen potentiellen Angstphänotyp hin detailliert analysiert. Zusätzlich zu sozial erfahrenen Mäusen in Gruppenhaltung wurden alle Untersuchungen auch an durch Einzelhaltung sozial deprivierten Mäusen durchgeführt, um den Einfluss von Haltungsbedingungen auf das Angstverhalten dieser Linie zu untersuchen.

Da Neurochondrin u.a. im Olfactory Bulb exprimiert wird (Istvanffy et al. 2004), könnte das von den Ncdn -/- Weibchen gezeigte soziale Interaktionsverhalten seine Ursache im nicht funktionierenden Geruchssinn haben. Um dies zu untersuchen, wurde der *Social Discrimination* Test durchgeführt. Dieser Test nutzt das natürliche olfaktorische Explorationsverhalten der Testtiere während der Exposition gegenüber einem bekannten und unbekanntem Artgenossen aus (s. Kapitel 4.2.9) und prüft darüber hinaus das Lern- und Gedächtnisverhalten (Engelmann et al. 1995; Bielsky and Young 2004; Richter et al. 2005) der Mäuse. Um diese Daten, sowie die der *Social Interaction* Tests, besser interpretieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich ein Test für die Wahrnehmung des Geruchs eines Artgenossen entwickelt. Dieser Test misst beim Testtier die olfaktorische Wahrnehmung von Pheromonen eines unbekanntem Artgenossen in der Testarena, ohne dass der Artgenosse selbst physisch anwesend ist. Dieser Test wurde anhand zweier Inzuchtstämme (C3HeB/FeJ und C57BL/6J), sowie eines Auszuchtstamms (CD1) validiert (s. **Abb. 32**) und anschließend bei den Untersuchungen der Neurochondrin-Mäuse eingesetzt.

Parallel dazu haben Untersuchungen gezeigt, dass Ncdn -/- Weibchen dieser Mauslinie eine vergrößerte Hirnanhangsdrüse mit proliferierenden laktotrophen Zellen aufweisen und dass der Prolaktin Gehalt in diesen Zellen erhöht war (Istvanffy 2006, nicht publiziert). Dafür zeigen die Blutwerte erniedrigten Prolaktin Gehalt im Diestrus, der Ruhephase des weiblichen Zyklus (Allen 1922), was für eine Rolle des Neurochondrins in der Regulation der Prolaktinausschüttung spricht. Insgesamt zeigt die Arbeit von Frau Dr. Istvanffy, dass diese Weibchen eine verringerte Ovulationsfähigkeit und eine unterdurchschnittliche Fruchtbarkeit besitzen, vermutlich aufgrund von hormoneller Dysbalance.

## 2 ERGEBNISSE

### 2.1 Teil 1: Validierung des modified Hole Boards

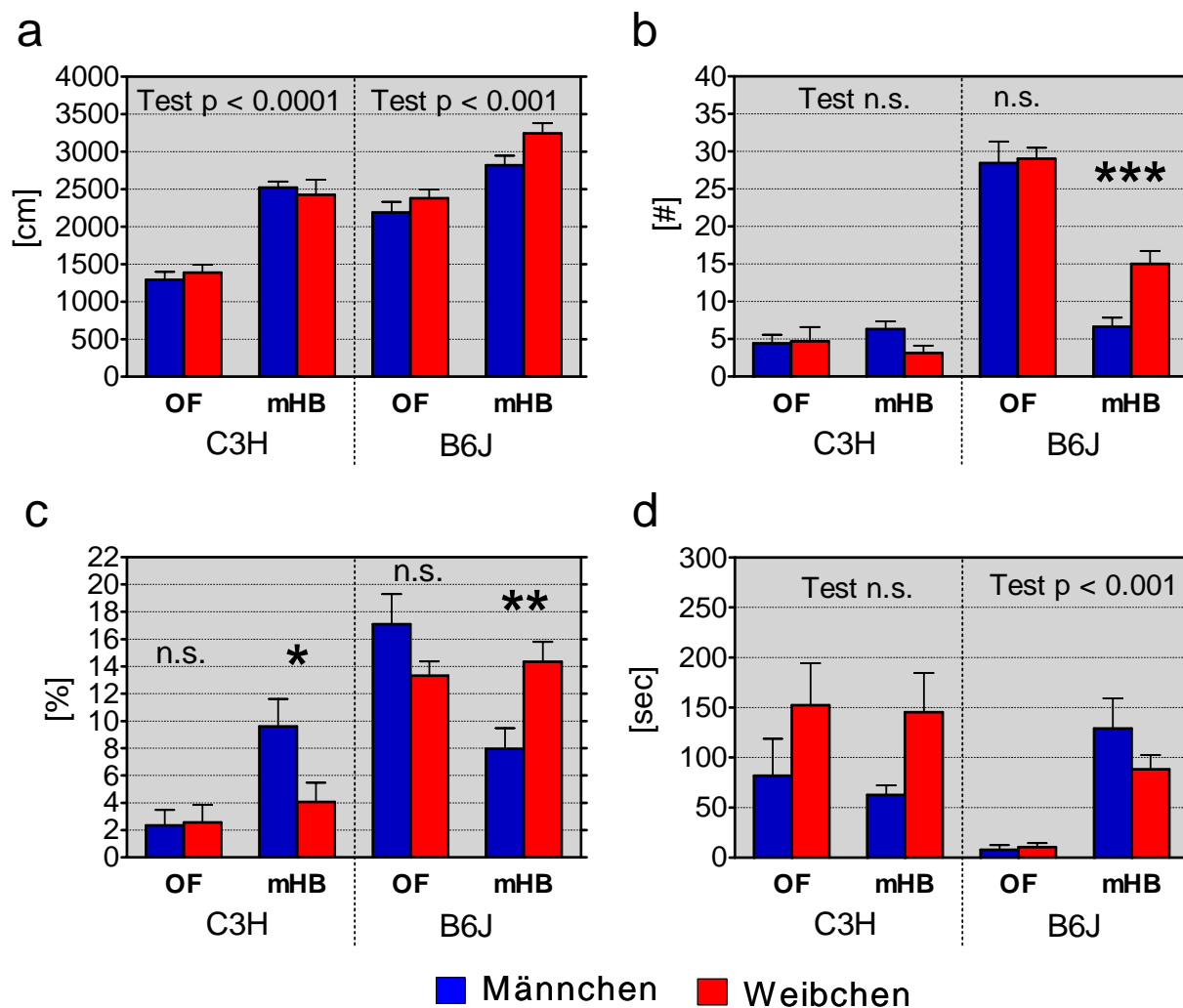
#### 2.1.1 Direkter Vergleich von *Open Field* zu mHB

*Lokomotion in der Arena:* Die Lokomotion hing vom Testparadigma ab. Sowohl C3H als auch B6J Mäuse zeigten erhöhte Lokomotion im mHB im Vergleich zum OF, da sie im mHB mehr Strecke zurücklegten (C3H:  $p < 0.0001$ ; B6J  $p < 0.001$ ). Die Aktivitätssteigerung fiel bei B6J jedoch geringer aus als bei C3H ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 6a**). Im mHB wie auch im OF waren C3H Männchen gleich aktiv wie C3H Weibchen und B6J Männchen weniger aktiv als B6J Weibchen ( $p < 0.01$ ).

*Angstkorreliertes Verhalten:* Die Analyse der Eintritte in das Zentrum und die dort verbrachte Zeit zeigte, dass die Parameter-Baselines von C3H und B6J in beiden Testparadigmen in Interaktionen von Stamm und Geschlecht variierten (Eintritte:  $p < 0.05$ ; Zeit:  $p < 0.001$ ). C3H Mäuse frequentierten die Zentren beider Tests gleich oft (**Abb. 6b**), verbrachten aber im mHB-Zentrum mehr Zeit ( $p < 0.001$ ) (**Abb. 6c**). Zudem waren C3H Männchen im länger mHB-Zentrum als C3H Weibchen ( $p < 0.05$ ), anders ( $p < 0.05$ ) als im OF, wo beide Geschlechter gleich viel Zeit im Zentrum verbrachten.

B6J Mäuse betraten das Zentrum im mHB seltener als im *Open Field* ( $p < 0.001$ ) (**Abb. 6b**). Da zudem B6J Männchen das mHB-Zentrum seltener frequentierten als B6J Weibchen ( $p < 0.001$ ), zeigten sich im mHB anders als im OF ( $p = 0.05$ ) Geschlechtsunterschiede in der Frequentierung des Zentrums. Parallel zu den Eintritten verbrachten B6J Mäuse im mHB weniger Zeit im Zentrum als im OF ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 6c**). Dies lag an den Männchen, die je nach Test im Vergleich zu den Weibchen ( $p < 0.01$ ) im mHB kürzer ( $p < 0.01$ ), im *Open Field* - obwohl *post hoc* nicht signifikant – länger im Zentrum blieben.

Die Latenz bis zum ersten Eintritt ins Zentrum unterschied sich zwischen den Stämmen mit dem Testparadigma ( $p < 0.01$ ). C3H Mäuse betraten in beiden Tests das Zentrum mit der gleichen Latenz (**Abb. 6d**) und C3H Weibchen begannen mit der Exploration des jeweiligen Zentrums später als C3H Männchen ( $p < 0.05$ ). Dagegen betraten B6J Mäuse das mHB-Zentrum später als das im *Open Field* ( $p < 0.001$ ), aber Männchen und Weibchen unterschieden sich nicht in der Latenz zum Explorationsbeginn der Zentren.



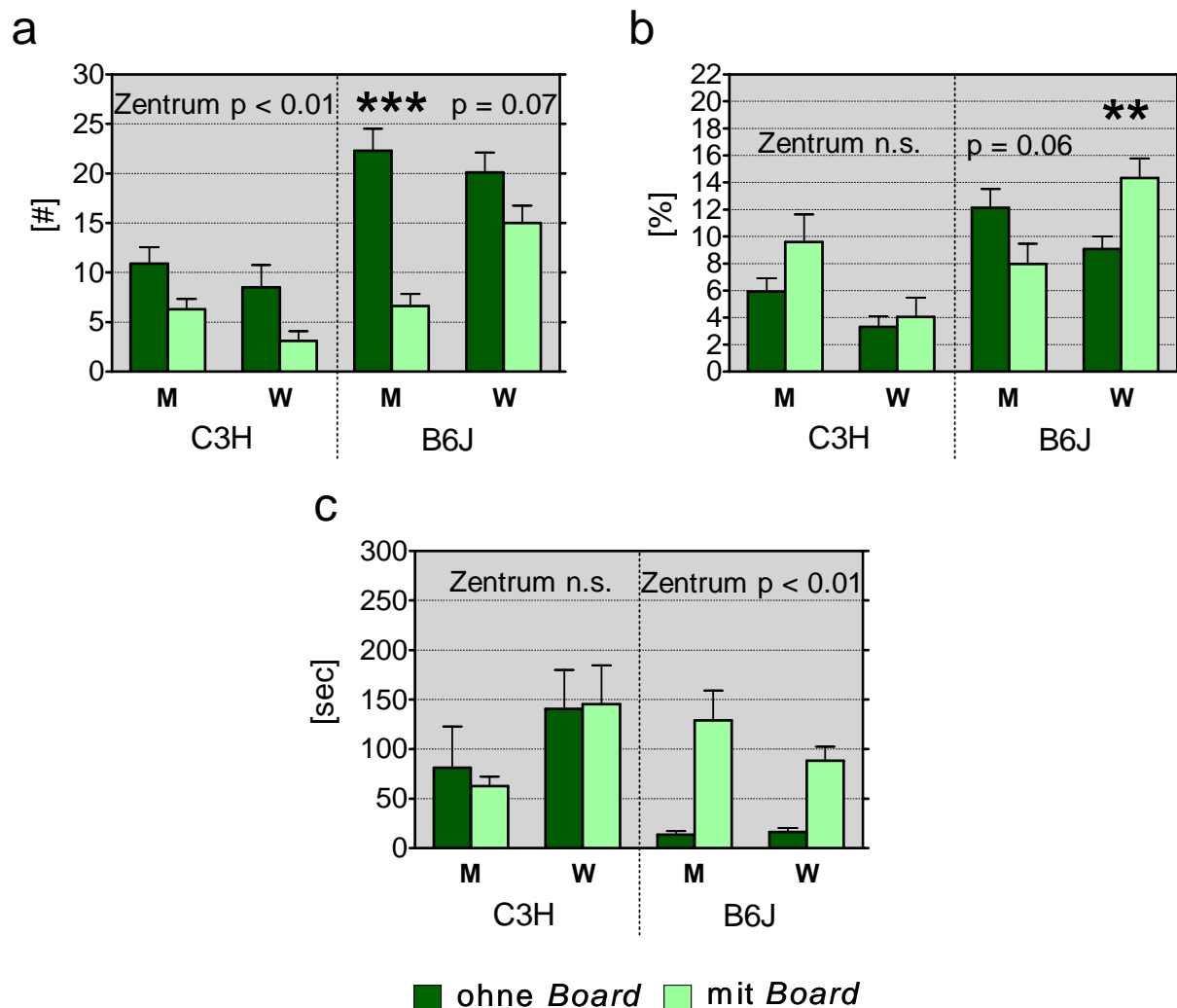
**Abbildung 6:** Lokomotion und angstkorreliertes Verhalten von C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6J) Mäusen beider Geschlechter in Abhängigkeit der Testparadigmen *Open Field* (OF) und *modified Hole Board* (mHB): gelaufene Distanz (a) und Anzahl der Eintritte in das Zentrum der Arena (b), im Zentrum verbrachte Zeit (c) sowie Latenz bis zum ersten Eintritt ins Zentrum (d). Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt,  $n = 9-10$ . *Stammspezifische* Unterschiede der Testparadigmen sind als Text dargestellt - Test  $p < 0.001$ , Test  $p < 0.0001$ , Test n.s. für nicht signifikante Unterschiede innerhalb eines Stammes; *Stammspezifische Geschlechtsunterschiede* innerhalb der Testparadigmen sind mit Sternchen versehen - \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  bzw. \*\*\*  $p < 0.001$  Männchen vs. Weibchen.



### 2.1.2 Einfluss des *Boards* in der mHB-Arena auf angstkorreliertes Verhalten

*Angstkorreliertes Verhalten*: Die Eintritte ins Zentrum (**Abb. 7a**) und die dort verbrachte Zeit (**Abb. 7b**) wurden von der Zentrumbeschaffenheit je nach Stamm und Geschlecht beeinflusst (Eintritte:  $p < 0.05$ ; Zeit:  $p < 0.01$ ). C3H beider Geschlechter betraten das *Board* seltener als das ebene Zentrum ( $p < 0.01$ ) und C3H Weibchen unterschieden sich nicht signifikant in den Zentrum-Eintritten von C3H Männchen. Die im Zentrum verbrachte Zeit war bei C3H Mäusen unabhängig von der Zentrumbeschaffenheit gleich hoch. Insgesamt verbrachten C3H Männchen mehr Zeit im Zentrum als C3H Weibchen ( $p < 0.01$ ). Wie C3H frequentierten B6J Mäuse das *Board* seltener als das ebene Zentrum, aber die Reduktion der Eintritte auf das *Board* war bei B6J Männchen stärker als bei B6J Weibchen ( $p < 0.01$ ) (Männchen:  $p < 0.001$ ; Weibchen:  $p = 0.07$ ). Parallel dazu verbrachten B6J Männchen in der mHB-Arena mit *Board* tendenziell weniger Zeit im Zentrum als ohne *Board* ( $p = 0.06$ ). Im Gegensatz dazu ( $p < 0.01$ ) verbrachten B6J Weibchen mehr Zeit im mHB-Zentrum, wenn das *Board* vorhanden war ( $p < 0.01$ ).

Die Latenz zum ersten Betreten des Zentrums war in beiden Stämmen unabhängig vom Geschlecht, aber im Gegensatz zu C3H Mäusen bei B6J Mäusen abhängig von der Zentrumbeschaffenheit ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 7c**): B6J Mäuse betraten das Zentrum mit *Board* signifikant später als wenn kein *Board* vorhanden war ( $p < 0.001$ ).



**Abbildung 7:** Lokomotion und angstkorreliertes Verhalten von C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6J) Mäusen beider Geschlechter im modified Hole Board Test in Abhängigkeit von der Zentrumsbeschaffenheit - Testung ohne und mit *Board*: Anzahl der Eintritte in das Zentrum der Arena (a), im Zentrum verbrachte Zeit insgesamt (b) und Latenz bis zum ersten Eintritt ins Zentrum (c). Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt, n = 9-10. *Stammspezifische* Effekte der Zentrumsbeschaffenheit sind als Text dargestellt - Zentrum  $p < 0.01$ , Zentrum n.s. für nicht signifikante Unterschiede; *Stammspezifische geschlechtsabhängige* Einflüsse der Zentrumsbeschaffenheit sind mit Sternchen versehen - \*\*  $p < 0.01$  bzw. \*\*\*  $p < 0.001$  und  $p = 0.07$  bzw.  $p = 0.06$  für Tendenzen bei ohne *Board* vs. mit *Board*. M = Männchen; W = Weibchen.

### 2.1.3 Einfluss der Blindheit bei C3H Mäusen auf das Verhalten im mHB

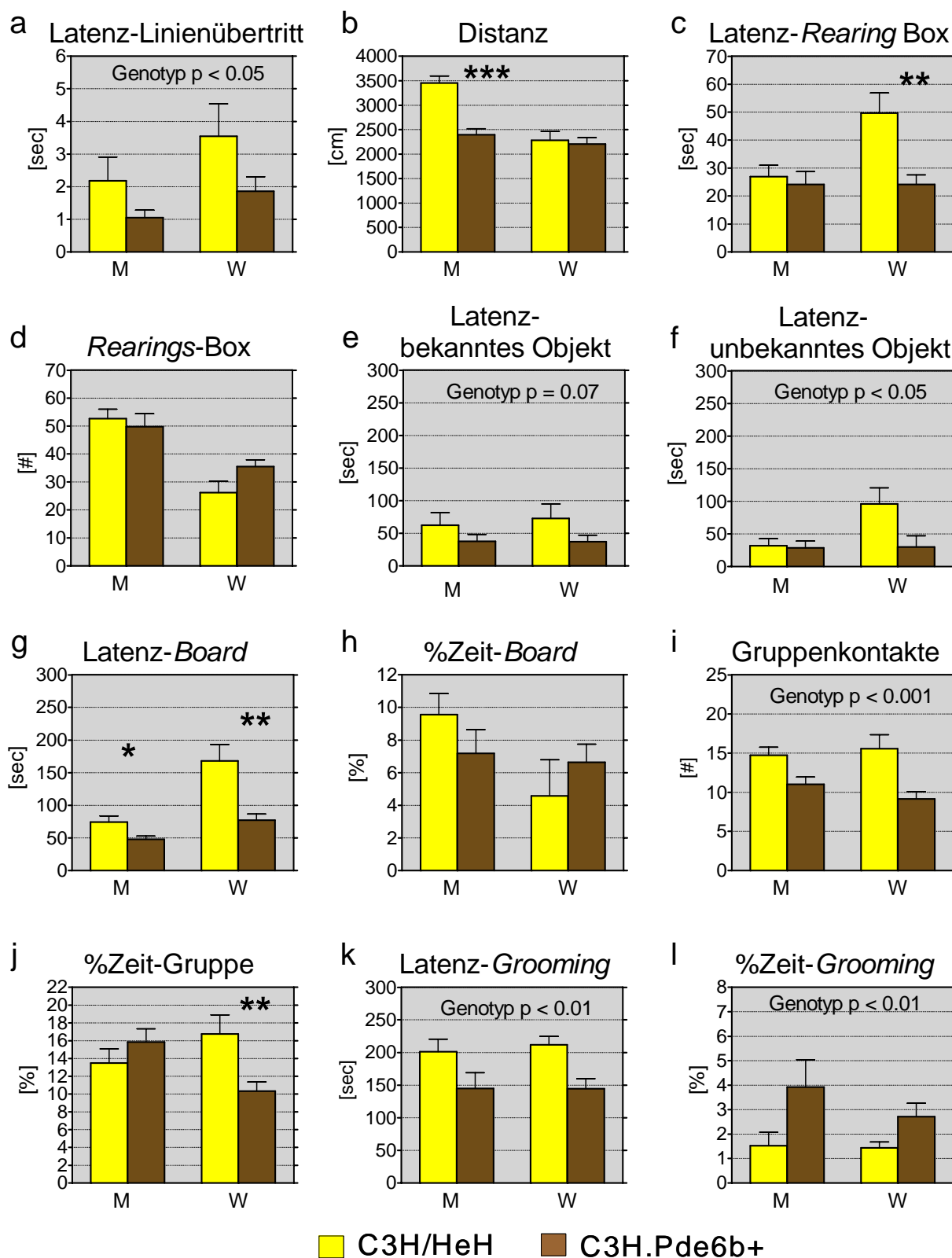
*Lokomotion:* Sehende C3H.Pde6b+ beider Geschlechter hatten niedrigere Latenzen zum ersten Linienübertritt als blinde C3H/HeH (**Abb. 8a**) ( $p < 0.05$ ). Die *Vorwärtslokomotion* war geschlechtsspezifisch ( $p < 0.01$ ) in C3H.Pde6b+ Männchen im Vergleich zu Kontrollmännchen reduziert, da C3H.Pde6b+ Männchen weniger Distanz zurücklegten ( $p < 0.001$ ) (**Abb. 8b**). Das *vertikale Explorationsverhalten* war ebenfalls geschlechtsabhängig ( $p < 0.05$ ) mit dem Genotyp verändert: C3H.Pde6b+ Weibchen zeigten *Rearings* in der Box genauso häufig wie C3H/HeH Weibchen, aber früher ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 8c, d**).

*Objektexploration:* C3H.Pde6b+ begannen mit der Exploration beider Objekte, dem Bekannten und dem Unbekannten, eher als C3H/HeH (**Abb. 8e, f**), wobei die Latenz zur Exploration des bekannten Objektes nur *tendenziell* niedriger war (unbekanntes Objekt:  $p < 0.05$ ; bekanntes Objekt:  $p = 0.07$ ). Die positiven Objektindices (C3H/HeH:  $0,14 \pm 0,09$ ; C3H.Pde6b+:  $0,05 \pm 0,06$ ) unterschieden sich nicht zwischen den Genotypen.

*Angstkorreliertes Verhalten:* C3H.Pde6b+ beider Geschlechter unterschieden sich *post hoc* nicht von C3H/HeH Mäuse in der auf dem *Board* verbrachten Zeit, betraten das *Board* aber signifikant früher, wobei dieser Effekt geschlechtsspezifisch ( $p < 0.05$ ) bei Weibchen ausgeprägter war als bei Männchen (Männchen  $p < 0.05$ ; Weibchen  $p < 0.01$ ) (**Abb. 8g, h**).

*Soziale Affinität:* C3H.Pde6b+ Mäuse machten weniger soziale Kontakte als die Kontrollen ( $p < 0.001$ ). Die mit sozialem Kontakt verbrachte Zeit war geschlechtsspezifisch ( $p < 0.001$ ) nur bei C3H.Pde6b+ Weibchen reduziert ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 8i, j**).

*Grooming-Verhalten:* C3H.Pde6b+ Mäuse beider Geschlechter zeigten mehr *Grooming*-Verhalten, da sie dieses Verhalten früher und länger aufwiesen (**Abb. 8k, l**) (Latenz:  $p < 0.01$ ; Dauer:  $p < 0.01$ ).



**Abbildung 8:** Unkonditioniertes Verhalten von sehenden C3H (C3H.Pde6b+) im Vergleich zu blinden C3H/HeH beider Geschlechter im modified Hole Board Test: Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt,  $n = 14-15$ . Genotypische Effekte (a, e-f, i, k-l) sind als Text dargestellt - Genotyp  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  und  $p < 0.001$ ,  $p = 0.07$  für Tendenz; Geschlechtsabhängige Einflüsse des Genotyps sind mit Sternchen versehen - \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  bzw. \*\*\*  $p < 0.001$  C3H.Pde6b+ vs. C3H/HeH. M = Männchen; W = Weibchen.

## 2.2 Teil 2: Einfluss von IVC-Käfighaltung

### 2.2.1 Untersuchungen an Männchen in Einzelhaltung

#### Modified Hole Board

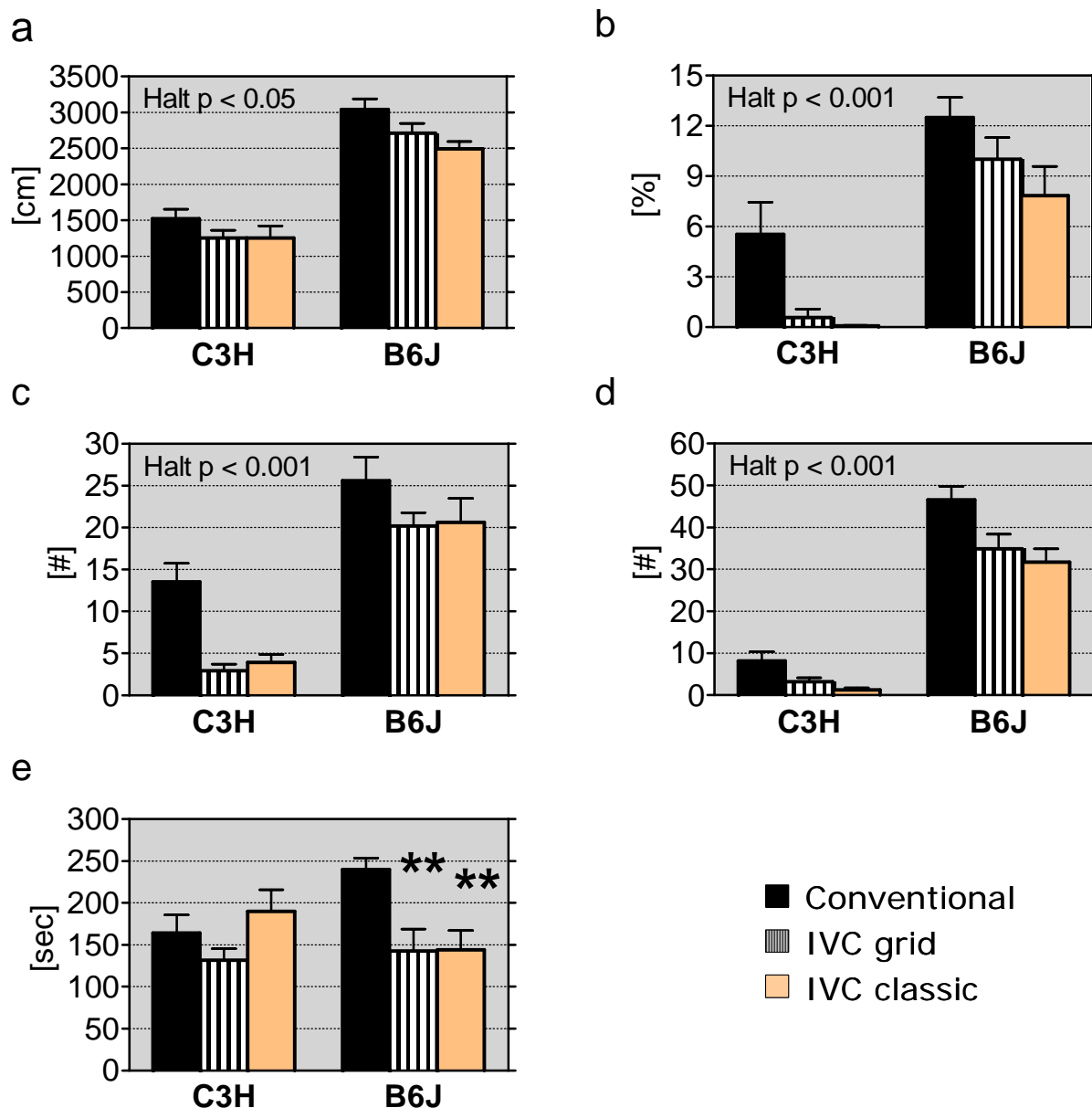
*Lokomotion:* Die lokomotorische Aktivität wurde von den Haltungsbedingungen signifikanten beeinflusst ( $p < 0.01$ ), und der Einfluss war in beiden Stämmen gleich. Männchen in konventionellen Käfigen waren aktiver als Männchen in IVC classics ( $p < 0.01$ ), da sie mehr Strecke liefen, und die Werte von IVC grid lagen dazwischen (**Abb. 9a**). Unabhängig von den Haltungsbedingungen waren B6J Männchen aktiver als C3H Männchen ( $p < 0.0001$ ).

*Angstkorreliertes Verhalten:* Unabhängig vom Stamm hatten die Haltungsbedingungen ( $p < 0.001$ ) den gleichen Effekt auf die auf dem *Board* verbrachte Zeit (**Abb. 9b**). Männchen beider Typen von IVCs unterschieden sich nicht in der auf dem *Board* verbrachten Zeit, verbrachten aber insgesamt weniger Zeit auf dem *Board* als Männchen in konventionellen Käfigen (IVC grid:  $p < 0.05$ ; IVC classic:  $p < 0.01$ ). Unabhängig von den Haltungsbedingungen verbrachten B6J Männchen mehr Zeit auf dem *Board* als C3H Männchen ( $p < 0.0001$ ).

*Explorationsaktivität:* Die Haltungsbedingungen hatten sowohl auf die vertikale (*Rearings*) (**Abb. 9c**) als auch auf die horizontale Explorationsaktivität (Exploration der Löcher) (**Abb. 9d**) den gleichen Effekt in beiden Stämmen (*Rearings*:  $p < 0.001$ ; Löcherexploration:  $p < 0.001$ ). IVC-gehaltene Männchen machten weniger *Rearings* und explorierten weniger Löcher als Männchen in konventionellen Käfigen (*Rearings*: IVC grid:  $p < 0.001$ ; IVC classic:  $p < 0.01$ ; Löcherexploration: IVC grid:  $p < 0.01$ ; IVC classic:  $p < 0.001$ ). Auch diese Parameter spiegelten das höhere Aktivitätsniveau von B6J Männchen wider, die unabhängig von den Haltungsbedingungen mehr *Rearings* machten und mehr Löcher explorierten als C3H Männchen (*Rearings*:  $p < 0.0001$ ; Löcherexploration:  $p < 0.0001$ ).

*Grooming-Verhalten:* Die Haltungsbedingungen hatten, gemessen an der Latenz zum ersten *Grooming*-Verhalten (**Abb. 9e**), einen unterschiedlichen Effekt auf das *Grooming*-Verhalten in beiden Stämmen ( $p < 0.05$ ). Die Latenz zum *Grooming*-Verhalten war bei C3H Männchen unabhängig von den Haltungsbedingungen gleich. In beiden Typen von IVCs zeigten B6J

Männchen in Vergleich zu B6J Männchen in konventionellen Käfigen eine niedrigere Latenz zum *Grooming*-Verhalten (je  $p < 0.01$ ). Es gab keinen generellen Stammunterschied in dieser Verhaltensdimension.



**Abbildung 9:** Einfluss von Haltungsbedingungen auf unconditioniertes Verhalten im modified Hole Board Test bei 9 Wochen alten einzelgehaltenen Männchen vom C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6J) Stamm; Lokomotorische Aktivität mit gelaufener Gesamtdistanz (a); angstkorreliertes Verhalten mit der Aufenthaltsdauer auf dem Board insgesamt (b); Explorationsniveau gemessen anhand von *Rearings* (c) und explorierter Löcher (d) und Grooming-Verhalten, gemessen anhand der Latenz bis zum ersten *Grooming* (e). Die Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt,  $n = 10$ . *Stammspezifische Unterschiede* von Haltungsbedingungen sind mit Sternchen versehen - \*\*  $p < 0.01$  IVC grid oder IVC classic vs. Conventional. *Stammunabhängige Unterschiede* von Haltungsbedingungen (Gelaufene Gesamtdistanz, Board-Aufenthalt, *Rearings* und explorierte Löcher) sind als Text dargestellt - Halt  $p < 0.05$  und Halt  $p < 0.001$  Conventional vs. IVC grid bzw. IVC classic.

### **Verstärkung des Schreckreflexes durch konditionierte Furcht (Fear Potentiated Startle, FPS)**

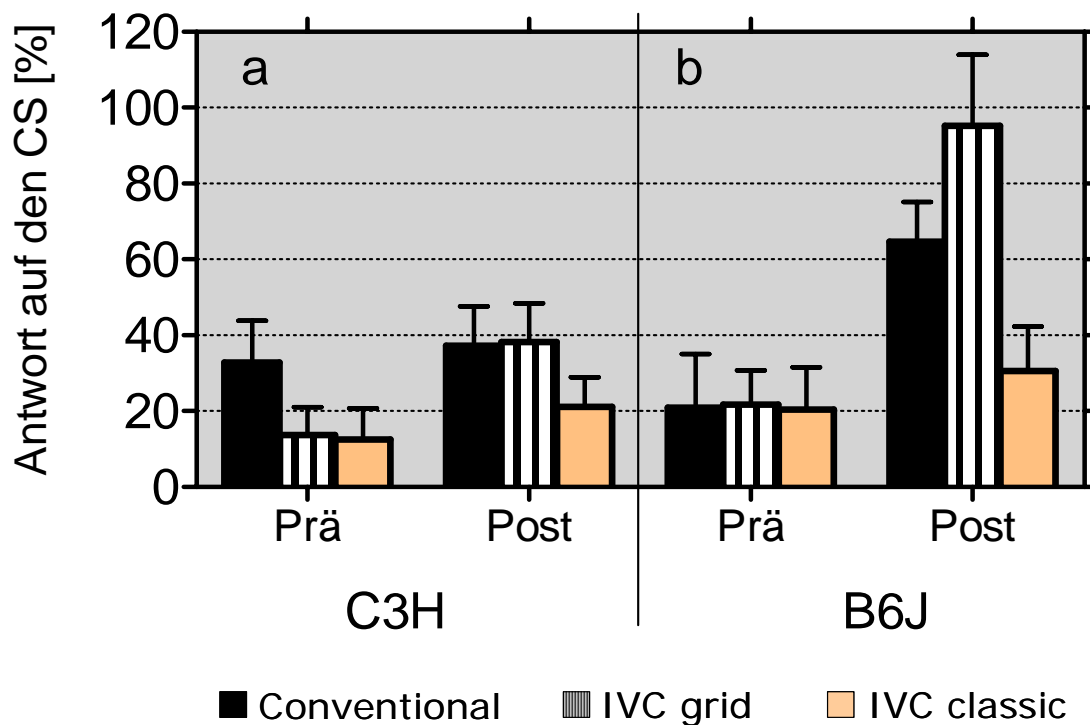
Die Analyse der *Prä-Konditionierung* zeigte weder Stammunterschiede im Prä-Konditionierungsniveau der Antwort auf den CS noch Einflüsse von Haltungsbedingungen auf diesen Parameter. Es gab ebenfalls keine signifikante Interaktion zwischen Stamm, Haltungsbedingungen und dem FPS Testparadigma. Die Analyse der Hauptfaktoren zeigte einen generellen Stammunterschied und Haltungseinfluss (Stamm:  $p < 0.05$ ; Haltung:  $p < 0.05$ ), und einen deutlichen Lerneffekt insgesamt ( $p < 0.001$ ). Es gab keine signifikante Interaktion zwischen den zwei abhängigen Faktoren Stamm und Haltung, aber einen *tendenziellen* Einfluss von Haltungsbedingungen auf die *Konditionierung* ( $p = 0.053$ ). Wie in **Abb. 10** zu sehen ist, zeigten Männchen beider Stämme in IVC grid Haltung den höchsten Anstieg des Schreckreflexes in der *Post-Konditionierung* im Vergleich zur Prä-Konditionierung. Insgesamt war die FPS-Performance stammabhängig ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 10**).

#### *FPS bei C3H Männchen:*

C3H Männchen lernten mit dem benutzten FPS-Protokoll nicht (**Abb. 10a**), und das war in allen Haltungsbedingungen gleich.

#### *FPS bei B6J Männchen:*

B6J Männchen lernten mit diesem FPS-Protokoll (**Abb. 10b**) ( $p = 0.001$ ), und die statistische Analyse ergab einen signifikanten Einfluss der Haltungsbedingungen ( $p < 0.05$ ), aber keine Interaktion.



**Abbildung 10: Einfluss von Haltungsbedingungen auf die Verstärkung des Schreckreflexes durch konditionierte Furcht im *Fear Potentiated Startle Test* (FPS) bei 10 Wochen alten einzelgehaltenen Männchen vom C3HeB/FeJ (a) und C57BL/6J (b) Stamm:** Schreckreflex auf den konditionierten Stimulus (CS) vor der Konditionierung (Prä); Schreckreflex auf den konditionierten Stimulus (CS) nach der Konditionierung (Post). Die Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt, n = 10.

### Der akustische Schreckreflex (ASR)

*ASR im Alter von 14 Wochen:* Wie erwartet zeigten C3H Männchen eine ASR-Kurve ( $p < 0.0001$ ) (**Abb. 11a**). Die Haltungsbedingungen beeinflussten den Schreckreflex bei C3H Männchen ( $p < 0.05$ ), obwohl sich der Kurvenverlauf des Schreckreflexes der drei Haltungsbedingungen nicht voneinander unterschied. Vergleiche zeigten, dass IVCs den Schreckreflex der C3H Männchen im Vergleich zum Schreckreflex der C3H Männchen in konventionellen Käfigen erhöhte. Diesbezüglich gab es keinen Unterschied zwischen den beiden IVC-Käfigen. Die Analyse der Schreckreflex-Schwelle von 14 Wochen alten C3H Männchen ergab eine Schreckreflex-Schwelle von 80 dB.

Auch B6J Männchen zeigten eine ASR-Kurve im Alter von 14 Wochen ( $p < 0.0001$ ) (**Abb. 11b**). Aber die Haltungsbedingungen hatten keine signifikante Auswirkung auf den Schreckreflex, und der Kurvenverlauf war in allen Haltungsbedingungen gleich. Die Schreckreflex-Schwelle war für 14 Wochen alte B6J Männchen ebenfalls von 80 dB.

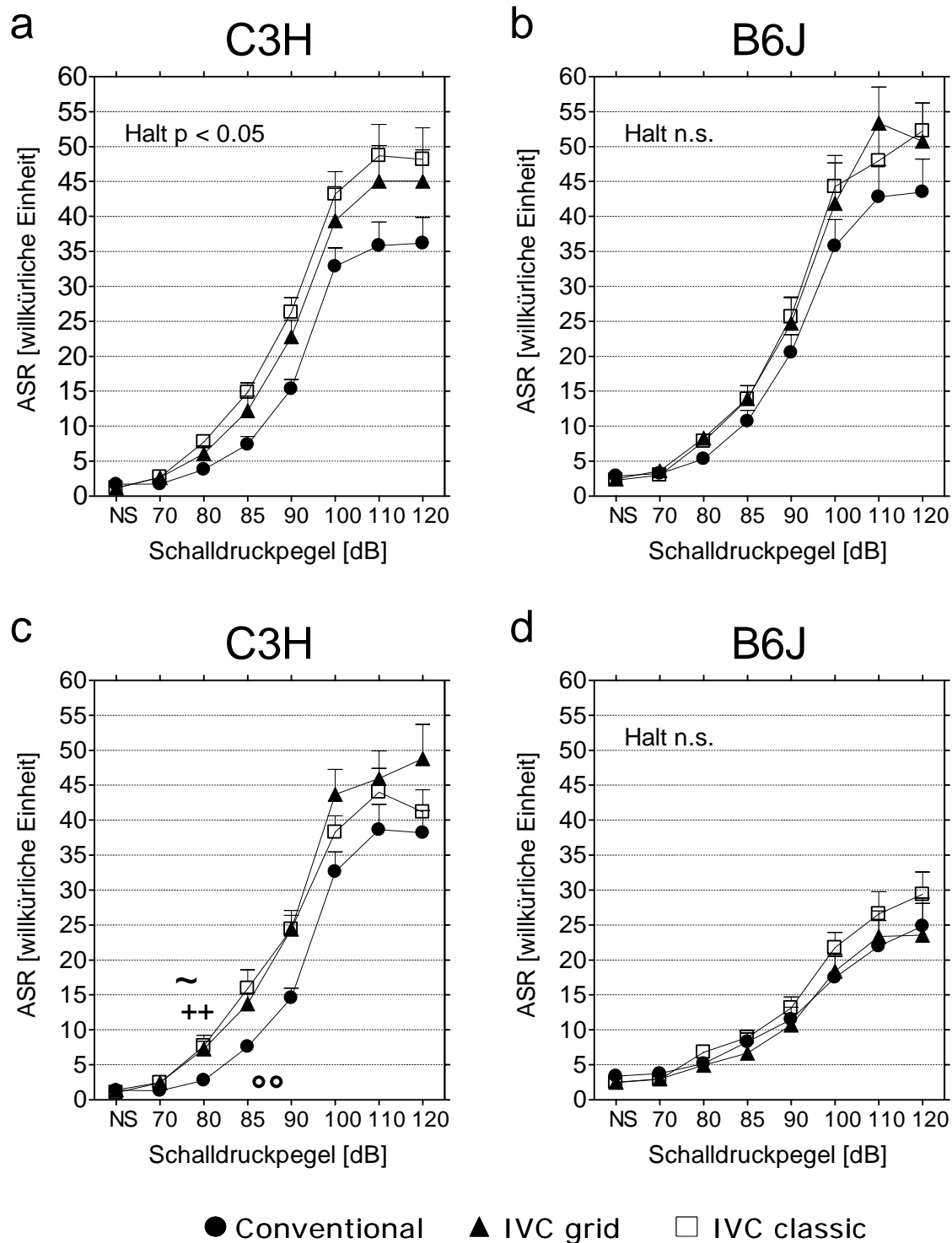


*ASR im Alter von 20 Wochen:* Wie zuvor zeigten C3H Männchen eine ASR-Kurve ( $p < 0.0001$ ), aber die Haltungsbedingungen beeinflussten den Verlauf der Schreckreflexkurve in diesem Alter unterschiedlich ( $p < 0,01$ ). Einzelanalysen der Haltungsbedingungen ergaben, dass C3H Männchen in konventionellen Käfigen eine Schreckreflex-Schwelle bei 85 dB aufwiesen. C3H Männchen in IVCs wiesen hingegen eine niedrigere Schreckreflex-Schwelle bei 80 dB auf (**Abb. 11c**).

Wie zuvor mit 14 Wochen, zeigten B6J Männchen auch im Alter von 20 Wochen eine ASR-Kurve ( $p < 0.0001$ ) und der Schreckreflex war unabhängig von den Haltungsbedingungen. Die Schreckreflex-Schwelle der 20 Wochen alten B6J Männchen lag auch hier bei 80 dB (**Abb. 11d**).

*Einfluss des Alters auf den Schreckreflex:* Bei C3H Männchen hatte das Alter keine Auswirkung auf die Höhe des Schreckreflexes, d.h. die Amplituden von 14 bzw. 20 Wochen alten C3H Männchen unterschieden sich nicht (**Abb. 11a, c**).

Bei B6J Männchen ergab sich eine Abhängigkeit der Schreckreflex-Amplitude vom Alter ( $p < 0.0001$ ): Im Alter von 20 Wochen zeigten B6J Männchen erniedrigte Amplituden im Vergleich zu Amplituden im Alter von 14 Wochen (**Abb. 11b, d**).



**Abbildung 11: Einfluss von Haltungsbedingungen auf den akustischen Schreckreflex (ASR) bei einzelgehaltenen Männchen vom C3HeB/FeJ (a, c) und C57BL/6J (b, d) Stamm:** Im Alter von 14 (a, b) und 20 Wochen (c, d). Die Daten sind gewichtsnormalisiert und als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt,  $n = 9-10$ . *Stammsspezifische* Unterschiede von Haltungsbedingungen sind als Text dargestellt - Halt  $p < 0.05$  Conventional vs. IVC grid bzw. IVC classic (a), Halt n.s. für nicht signifikante Unterschiede innerhalb eines Stammes (b, d); im Falle einer signifikanten Interaktion *Haltung*  $\times$  *dB* (c) sind die unterschiedlichen Schreckreflex-Schwellen gekennzeichnet: °°  $p < 0.01$  Schreckreflex-Schwelle Conventional, ~  $p < 0.05$  Schreckreflex-Schwelle IVC grid, ++  $p < 0.01$  Schreckreflex-Schwelle IVC classic.

## 2.2.2 Untersuchungen an Mäusen beider Geschlechter in Gruppenhaltung

### Modified Hole Board

*Lokomotion:* Die Haltungsbedingungen beeinflussten die gelaufene Distanz von C3H und B6J stammspezifisch ( $p < 0.001$ ) (**Abb. 12a**). C3H beider Geschlechter waren sowohl in konventioneller Haltung wie in IVC Haltung gleich aktiv. B6J beider Geschlechter hingegen legten in IVC classic weniger Strecke als in konventioneller Haltung zurück ( $p < 0.001$ ). Insgesamt waren gruppengehaltene B6J aktiver als gruppengehaltene C3H ( $p < 0.001$ ).

*Angstkorreliertes Verhalten:* Der Einfluss der Haltungsbedingungen auf die auf dem *Board* verbrachte Zeit (**Abb. 12b**) variierte mit dem Stamm und Geschlecht (Eintritte:  $p < 0.05$ ; Zeit:  $p < 0.05$ ). IVC gehaltene C3H Mäuse unterschieden sich nicht signifikant von konventionell gehaltenen und C3H Männchen verbrachten mehr Zeit auf dem *Board* als C3H Weibchen ( $p < 0.05$ ). Hingegen verbrachten IVC gehaltene B6J Männchen im Vergleich zu konventionell gehaltenen *tendenziell* ( $p = 0.06$ ) weniger Zeit auf dem *Board*. Dies war bei B6J Weibchen umgekehrt ( $p < 0.001$ ): IVC gehaltene B6J Weibchen verbrachten mehr Zeit auf dem *Board* ( $p < 0.001$ ).

*Explorationsaktivität:* Beide Stämme unterschieden sich in der vertikalen Exploration (*Rearing*-Anzahl) unabhängig von den Haltungsbedingungen: C3H Mäuse explorierten vertikal mehr als B6J Mäuse ( $p < 0.05$ ) und pro Stamm waren Männchen aktiver als Weibchen ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 12c**).

Dagegen waren Unterschiede in der Anzahl der explorierten Löcher auf dem *Board* abhängig von Stamm, Haltung und Geschlecht ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 12d**). IVC gehaltene C3H Mäuse explorierten die gleiche Anzahl an Löchern wie konventionell gehaltene, wobei C3H Männchen insgesamt mehr explorierten als C3H Weibchen ( $p < 0.01$ ). Bei B6J Mäusen explorierten IVC gehaltene Männchen weniger ( $p < 0.05$ ), IVC gehaltene Weibchen hingegen ( $p < 0.001$ ) mehr Löcher als die entsprechend konventionell gehaltenen B6J Mäuse, wobei diese Beobachtung bei Weibchen nicht signifikant war.

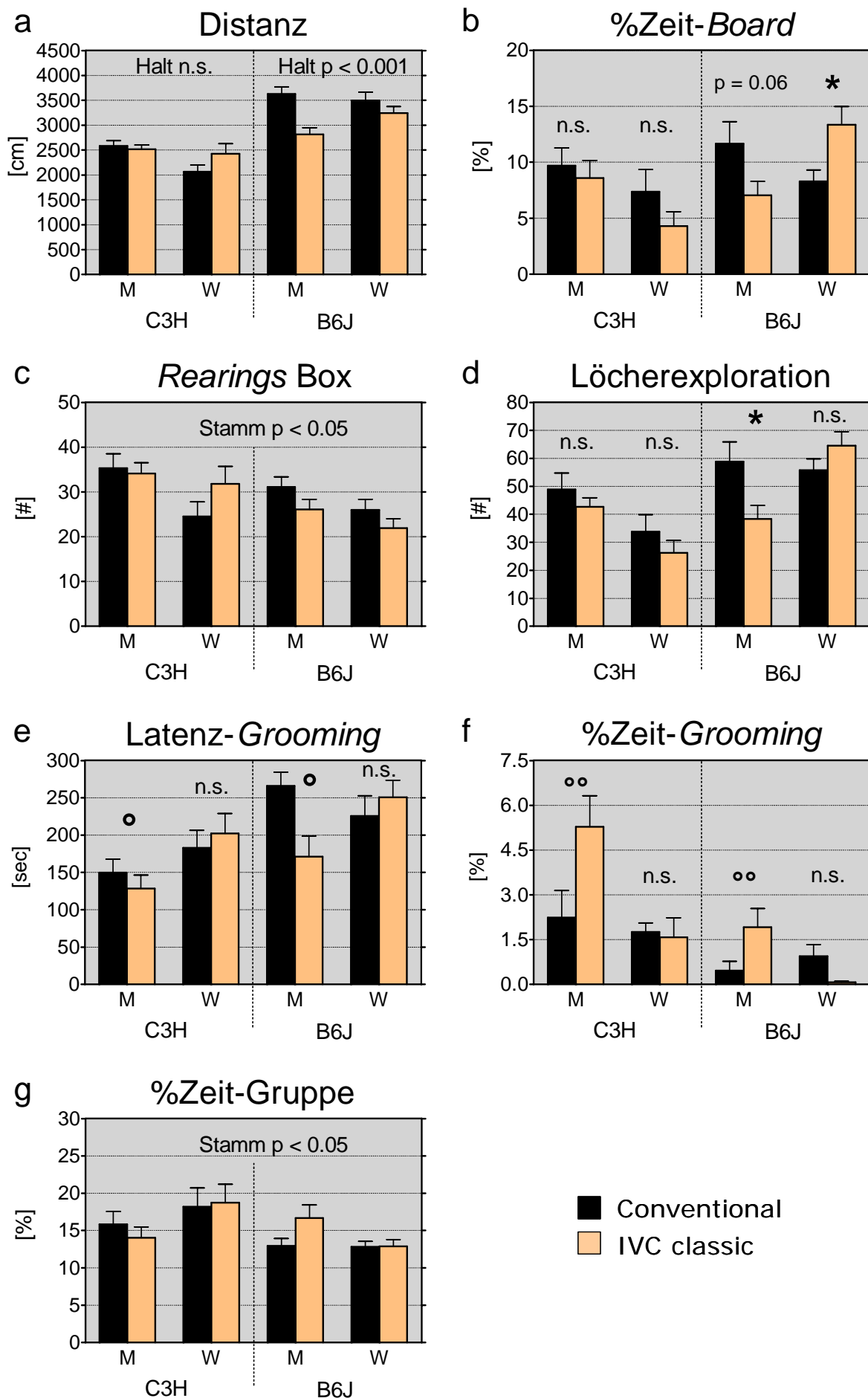
*Grooming-Verhalten:* Geschlechtsspezifisch unterschied sich das *Grooming*-Verhalten von IVC und konventionell gehaltenen Weibchen beider Stämme nicht voneinander: unter beiden

Haltungsbedingungen zeigten Weibchen gleiche Latenzen zum ersten *Grooming*-Verhalten (**Abb. 12e**) sowie gleiche Dauer dieses Verhaltens (**Abb. 12f**). Im Vergleich dazu war dies bei Männchen beider Stämme anders (Latenz:  $p < 0.05$ ; Zeit:  $p < 0.01$ ): IVC gehaltene Männchen zeigten im Vergleich zu konventionell gehaltenen *Grooming*-Verhalten früher ( $p < 0.01$ ) und mit erhöhter Dauer ( $p < 0.001$ ). Insgesamt zeigten B6J Männchen das *Grooming*-Verhalten weniger intensiv als C3H Männchen ( $p < 0.01$ ).

*Sozialverhalten*: Die mit sozialem Kontakt verbrachte Zeit (**Abb. 12g**) wurde in beiden Stämmen nicht von den Haltungsbedingungen beeinflusst. Insgesamt verbrachten B6J durchschnittlich weniger Zeit mit sozialem Kontakt ( $p < 0.05$ ).

**Abbildung 12: Einfluss von Haltungsbedingungen auf unkonditioniertes Verhalten im modified Hole Board Test bei 9 Wochen alten gruppengehaltenen Mäusen beider Geschlechter vom C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6J) Stamm.** Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt,  $n = 9-10$ . *Stammspezifische* Unterschiede von Haltungsbedingungen sind als Text dargestellt - Halt  $p < 0.01$ , Halt  $p < 0.001$ , Halt n.s. für nicht signifikante Unterschiede innerhalb eines Stammes; *Geschlechtsspezifische* Unterschiede von Haltungsbedingungen sind mit einem Kreis versehen - °  $p < 0.05$  bzw. °°  $p < 0.01$  IVC classic vs. Conventional - bzw. mit n.s. für nicht signifikante Unterschiede. *Stammspezifische Geschlechtsunterschiede* von Haltungsbedingungen sind mit Sternchen versehen - \*  $p < 0.05$  IVC classic vs. Conventional - und  $p = 0.06$  für eine Tendenz. *Stammunterschiede* sind als Text dargestellt: Stamm  $p < 0.05$ . M = Männchen; W = Weibchen.

---



## 2.3 Teil 3: Nützlichkeit des mHB im Verhaltensprimärscreen der German Mouse Clinic

### 2.3.1 Vergleich mit bereits publizierten Phänotypen – der PWD/PH Stamm und die CRHR1 knockout Mauslinie

#### Der PWD/PH Stamm im Vergleich zu C57BL/6J im mHB

*Lokomotion:* Im mHB wiesen PWD Mäuse im Vergleich zu B6J Mäusen reduzierte Lokomotion auf: Sie legten insgesamt weniger Strecke zurück ( $p < 0.001$ ) (**Abb. 13a**), bewegten sich aber mit erhöhter Geschwindigkeit ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 13b**).

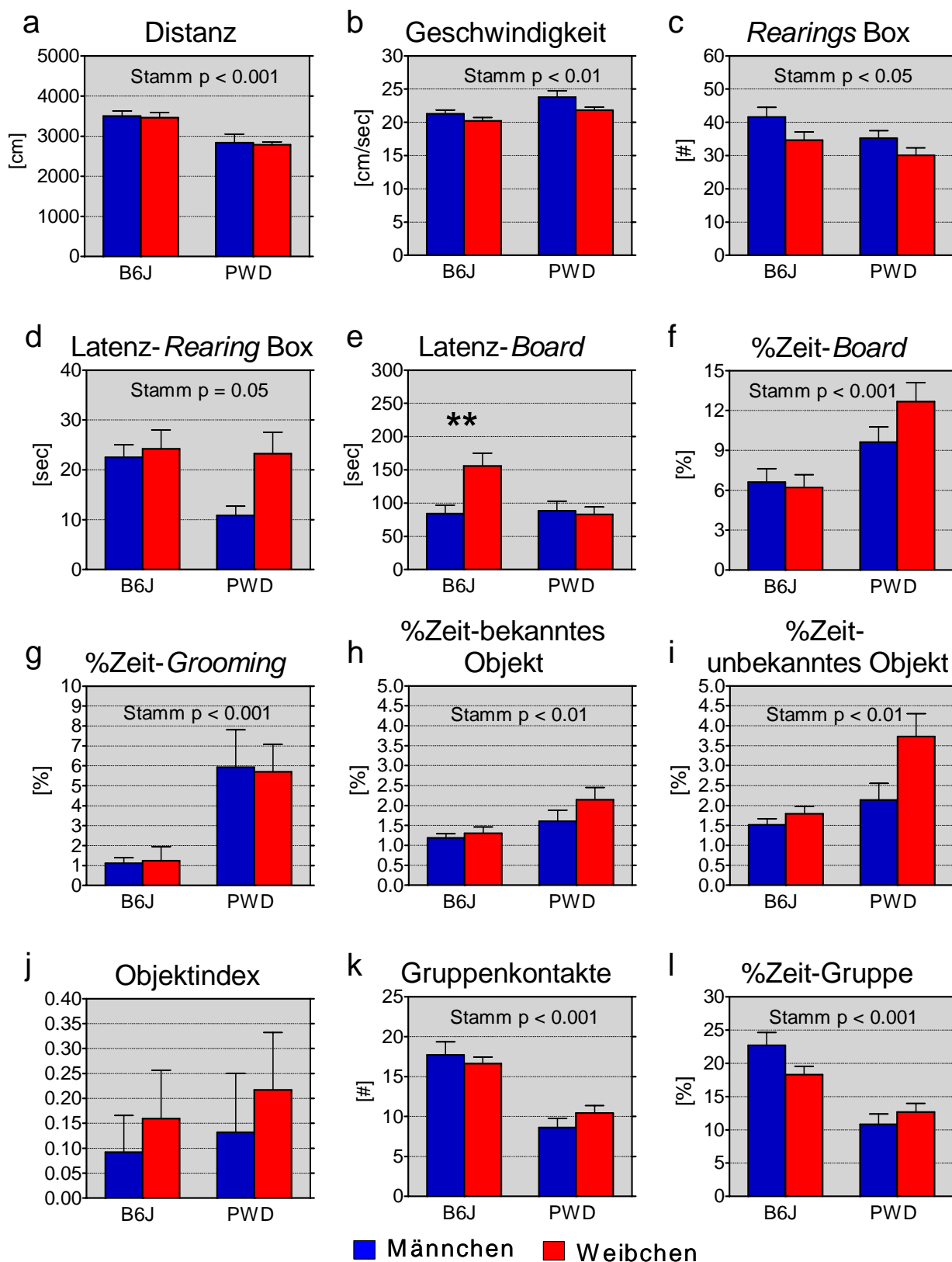
*Vertikale Exploration:* PWD Mäuse beider Geschlechter zeigten weniger *Rearings* als B6J Mäuse ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 13c**), aber *tendenziell* frühere, wie aus niedrigeren Latenzen zum ersten *Rearing* ersichtlich ( $p = 0.05$ ) (**Abb. 13d**). Im Gegensatz zu B6J Mäusen wurde bei PWD Mäusen beider Geschlechter vertikales Sprungverhalten beobachtet. Dabei waren beim Sprungverhalten alle vier Pfoten ohne Kontakt zum Boden der Testarena, entsprechend den von Fernandes *et al.*, 2004 berichteten *jump escapes*. Da *jump escapes* bei Inzuchtstämmen selten zu beobachten sind, waren sie kein Standardparameter in diesem Test, so dass das Auftreten dieses Verhaltens bei PWD Mäusen nur qualitativ beobachtet und notiert, nicht aber quantifiziert wurde.

*Angstkorreliertes Verhalten:* PWD Mäuse betraten das *Board* früher als B6J Mäuse ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 13e**), wobei dieser Genotyp-Effekt geschlechtsspezifisch ( $p < 0.05$ ) durch erhöhte Latenz zum ersten *Board*-Eintritt bei B6J Weibchen im Vergleich zu B6J Männchen ( $p < 0.01$ ) bedingt war. Insgesamt verbrachten PWD Mäuse mehr Zeit auf dem *Board* ( $p < 0.001$ ) (**Abb. 13f**).

*Grooming-Verhalten:* PWD Mäuse verbrachten mehr Zeit mit *Grooming* als B6J, wie aus einer erhöhten *Grooming*-Dauer deutlich wurde ( $p < 0.001$ ) (**Abb. 13g**).

*Objektexploration:* PWD Mäuse verbrachten mehr Zeit mit der Exploration beider Objekte (bekanntes Objekt:  $p < 0.01$ ; unbekanntes Objekt:  $p < 0.01$ ) (**Abb. 13h-i**). Beide Stämme wiesen positive, aber keine unterschiedlichen Objektindices auf (**Abb. 13j**).

*Soziale Affinität:* Während des Testens machten PWD Mäuse weniger Kontakte zur sozialen Gruppe als B6J Mäuse ( $p < 0.001$ ) (**Abb. 13k**). Die im sozialen Kontakt verbrachte Zeit war bei PWD Mäusen beider Geschlechter gegenüber B6J reduziert ( $p < 0.001$ ) (**Abb. 13l**).



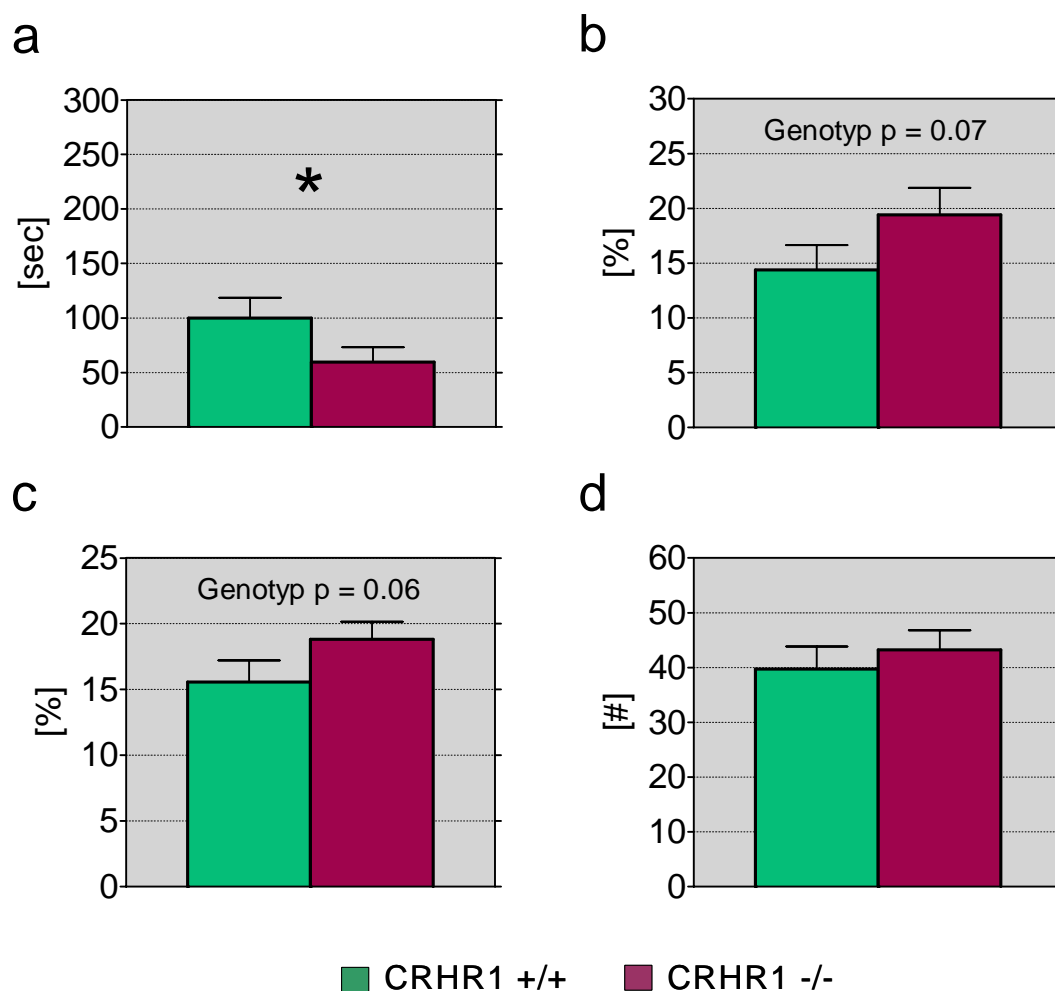
**Abbildung 13: Verhaltensanalyse unconditionierten Verhaltens von PWD/PH (PWD) Mäusen im Alter von 8-9 Wochen im mHB im Vergleich zu C57BL/6J (B6J).** Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt,  $n = 10-15$ . Stammspezifische Unterschiede sind als Text dargestellt - Stamm  $p = 0.05$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  bzw.  $p < 0.001$ . Stammspezifische Geschlechtsunterschiede sind mit Sternchen versehen - \*  $p < 0.01$  B6J Weibchen vs. B6J Männchen.



## Die CRHR1 knockout Mauslinie

### Light Dark Box

Die Analyse des angstkorrelierten Verhaltens von CRHR1 ko Mäusen in der *Light Dark Box* zeigte, dass CRHR1 -/- Mäuse das helle Kompartiment im Vergleich zu den Kontrollen früher betreten ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 14a**) und dort *tendenziell* mehr Zeit verbrachten ( $p = 0.07$ ) (**Abb. 14b**). Der Anteil der Eintritte ins helle Kompartiment bezogen auf die Gesamteintritte aller drei Bereiche war in CRHR1 -/- Mäusen *tendenziell* höher als bei den Kontrollen ( $p = 0.06$ ) (**Abb. 14c**). Die generelle Vorwärtslokomotion als Summe aller Eintritte war in beiden Genotypen gleich (**Abb. 14d**).



**Abbildung 14: Unkonditioniertes Verhalten der CRHR1 knockout Mäuse im Alter von 12-19 Wochen in der Light Dark Box:** Latenz zum ersten Eintritt ins helle Kompartiment (a), Gesamtaufenthaltsdauer im hellen Kompartiment (b), Prozentualer Anteil der Eintritte ins helle Kompartiment (c) und Gesamteintritte (d). \*  $p < 0.05$ ,  $p = 0.06$  und  $p = 0.07$  CRHR1 -/- vs. +/+.

***Modified Hole Board***

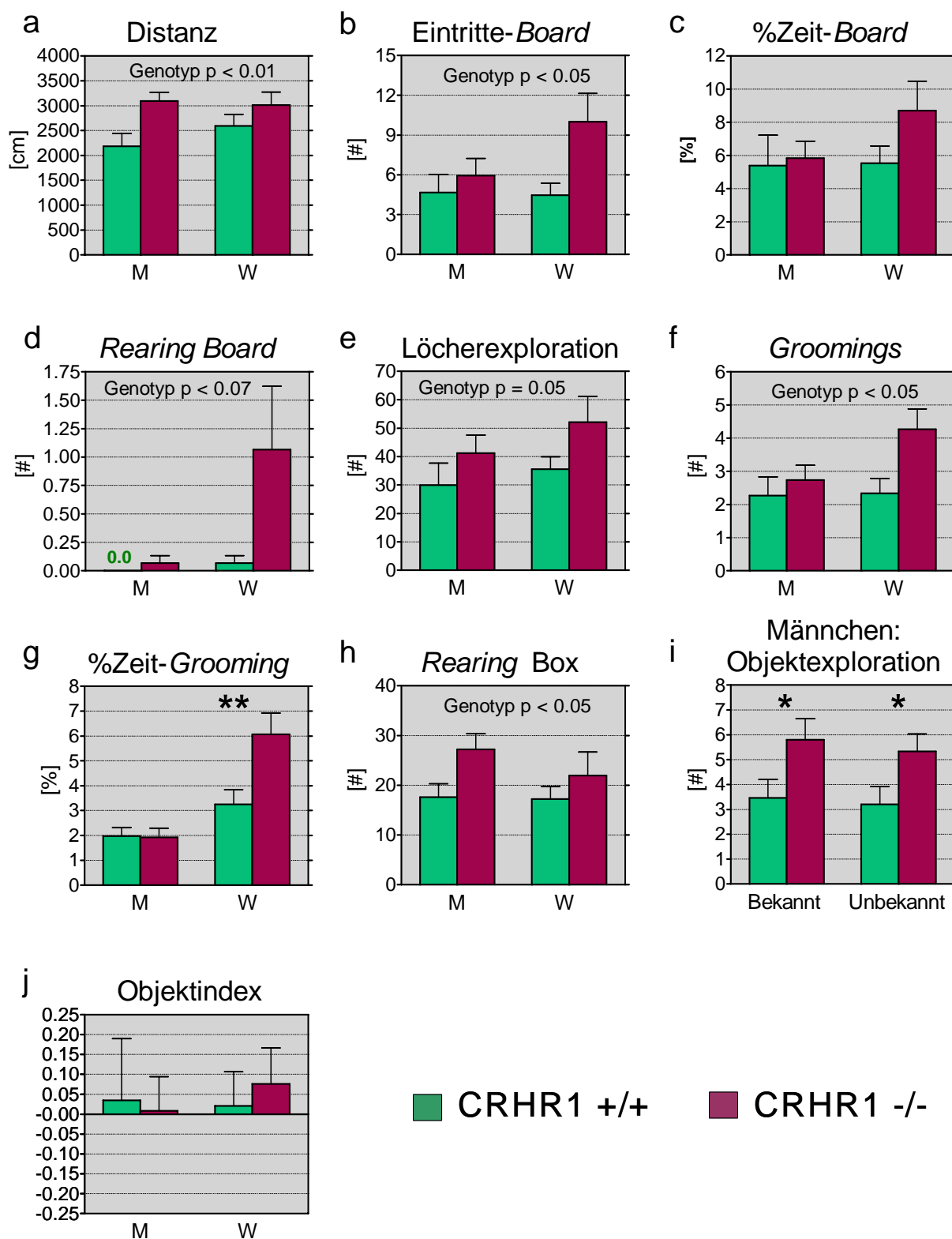
*Vorwärtslokomotion:* Die Analyse von CRHR1  $-/-$  Mäusen im mHB zeigte, dass die Vorwärtslokomotion in Mutanten beider Geschlechter erhöht war, da sie mehr Wegstrecke zurücklegten als die Kontrollen ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 15a**).

*Angstkorreliertes Verhalten:* CRHR1  $-/-$  Mäuse betraten das *Board* häufiger als die Kontrollen ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 15b**), die Aufenthaltsdauer auf dem *Board* war aber gleich (**Abb. 15c**). Auf dem *Board* explorierten CRHR1  $-/-$  Mäuse beider Geschlechter *tendenziell* mehr, da sie häufiger *Rearings* zeigten ( $p < 0.07$ ) (**Abb. 15d**) und mehr Löcher explorierten als die Kontrollen ( $p = 0.05$ ) (**Abb. 15e**).

*Grooming-Verhalten:* CRHR1  $-/-$  Mäuse beider Geschlechter zeigten häufiger *Grooming*-Verhalten ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 15f**), aber nur Weibchen ( $p < 0.05$ ) zeigten eine erhöhte *Grooming*-Dauer ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 15g**).

*Vertikale Exploration:* Im Vergleich zu Kontrollen war bei CRHR1  $-/-$  Mäusen die *Rearing*-Aktivität in der Box erhöht ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 15h**).

*Objektexploration:* Geschlechtsspezifisch (bekanntes:  $p < 0.05$ ; unbekanntes:  $p = 0.05$ ) explorierten CRHR1  $-/-$  Männchen beide Objekte, das Bekannte und das Unbekannte, häufiger (je  $p < 0.05$ ) (**Abb. 15i**). Die Objektindices waren in beiden Genotypen gleich (**Abb. 15j**).

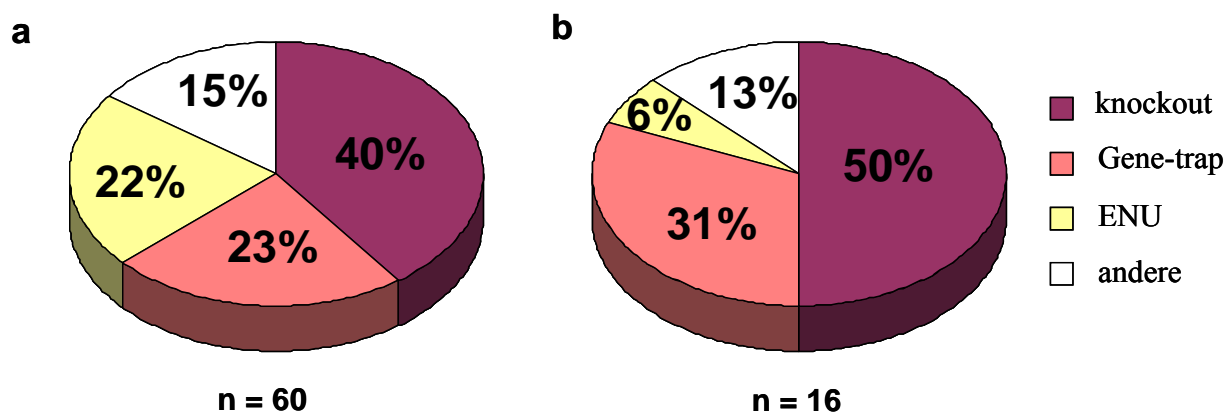


**Abbildung 15: Verhaltensanalyse unconditionierten Verhaltens von CRHR1 knockout Mäusen beider Geschlechter im Alter von 13-20 Wochen im mHB.** Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt, n = 15. Genotypische Unterschiede sind als Text dargestellt - Genotyp p = 0.05, p < 0.05 bzw. p < 0.01. Geschlechtsspezifische Genotypenunterschiede sind mit Sternchen versehen - \* p < 0.05 bzw. \*\* p < 0.01 -/- vs. +/+. M = Männchen; W = Weibchen.

### 2.3.2 Effizienz im Primärscreen – mutante Mauslinien innerhalb des GMC-Workflows

Die Zusammenstellung von 62 analysierten Mauslinien im mHB mit dem Ziel der primären Phänotypendetektion ergab, dass mit  $n = 60$  der Großteil der Untersuchungen mutante Linien waren und die restlichen 2 Stammcharakterisierungen (PWD/PH und C3H\_sehend). 40% der mutanten Mauslinien waren gezielte Mutationen durch knockout und 23% durch Gene-Trap-Technologie, 22% induzierte ENU-Mutationen und die restlichen 15% entfielen auf andere Arten der Mutationen wie z.B. knock-in Technologie, spontane Mutationen, Consomics usw. (**Abb. 16a**).

Der Vergleich der prozentualen Verteilung der Mutations-Techniken in mutanten Mauslinien ohne primären Phänotyp\* (**Abb. 16b**) mit dem entsprechenden Muster der prozentualen Verteilung im Gesamtpool der untersuchten Mutanten (**Abb. 16a**) ergab, dass in beiden Fällen knockout Mauslinien am stärksten vertreten waren (a: 40%; b: 50%) gefolgt von Gene-Trap Mauslinien (a: 23%; b: 31%). Die Prozentsätze dieser zwei Gen-Techniken waren mit 8-10% in den Mauslinien ohne Phänotyp (**Abb. 16b**) verglichen mit ihrer Verteilung im Gesamtpool der Mauslinien (**Abb. 16a**) stärker vertreten. Mit anderen Techniken hergestellte Mauslinien waren dem prozentualen Anteil nach mit 13% der Linien ohne Phänotyp zu 15% im Gesamtpool nicht unterschiedlich in ihrer Verteilung. ENU-mutante Mauslinien machten mit 6% den geringsten Anteil der Mauslinien ohne Phänotyp aus, während ihr Anteil an allen mutanten Mauslinien mit 22% dem der Gene-Trap Mauslinien (23%) entsprach.

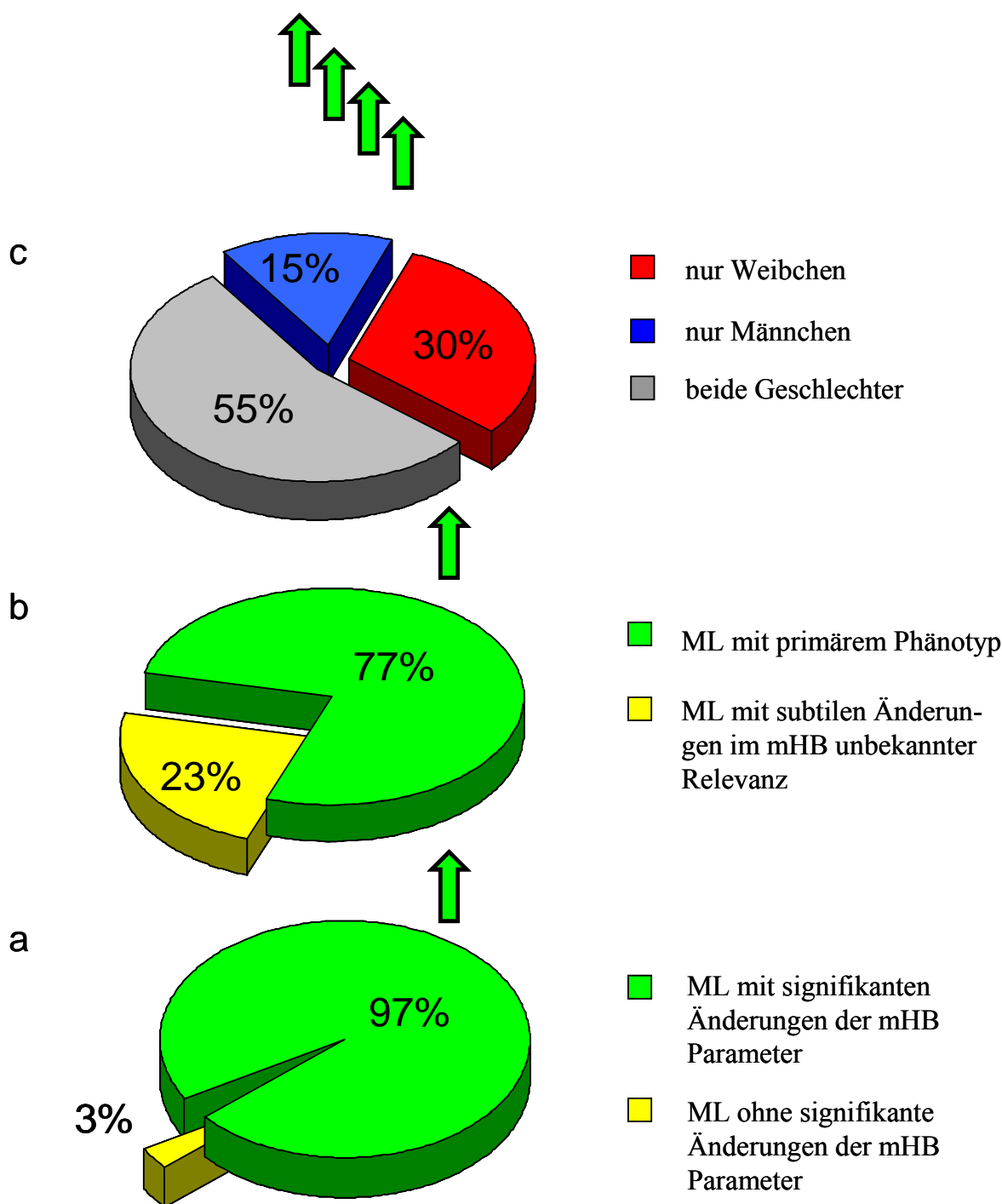


**Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der angewendeten Mutations-Techniken zur Herstellung der im mHB untersuchten Mauslinien (ML) in Bezug auf (a) alle im mHB analysierten mutanten ML ( $n = 60$ ) und (b) auf die mutanten ML ohne primären Phänotyp ( $n = 16$ ).**

\* Anzahl mutanter Mauslinien ohne signifikante Änderungen der mHB Parameter (3%,  $n = 2$ ) + Anzahl mutanter Mauslinien mit subtilen Änderungen im mHB unbekannter Relevanz (23% der Mutanten mit signifikanten Änderungen der mHB Parameter,  $n = 14$ ; vgl. **Abb., S. 54**)

Von den 62 im Primärscreen (mHB) auf Verhaltensphänotypen zu untersuchenden Mauslinien zeigten 97% signifikante Veränderungen zwischen Kontrollen und Mutanten in irgendeinem der mHB Parameter (**Abb. 17a**). In 23% dieser Fälle ergaben die signifikant veränderten mHB Parameter keine Verhaltensmuster, die einem Verhaltensphänotyp zugeordnet werden konnten und somit als subtile Verhaltensänderungen der Mutanten mit unbekannter Relevanz eingeordnet wurden. Die restlichen 77% zeigten mit ihren veränderten mHB Parametern Verhaltensmuster, die mindestens einem Phänotyp zugeordnet und somit klassifiziert werden konnten (**Abb. 17b; Tab. 1**). Dabei waren hier 55% der Phänotypen geschlechtsunabhängig, 15% nur in Männchen und 30% nur in Weibchen festzustellen (**Abb. 17c; Tab. 1**). In einer Mauslinie wurden nur Weibchen untersucht (n = 1, d.h. 2% der Linien mit Phänotyp), die aber in diese Analyse mit eingegangen sind. Diese Statistik beinhaltete ebenfalls Mauslinien mit bereits bekanntem Phänotyp (n = 6, d.h. 13% der Linien mit Phänotyp), deren Phänotypen im mHB bestätigt werden konnten und darüber hinaus Änderungen in zusätzlichen Verhaltensdimensionen im Primärscreen beschrieben werden konnten. Insgesamt wurden 63% der Fälle mit primärem Phänotyp im mHB als interessante Mauslinien für detailliertere, hypothesengeleitete Verhaltensuntersuchungen in Sekundär-/Tertiärscreens deklariert (**Abb. 17d**).

## d 63% für detailliertere Analysen

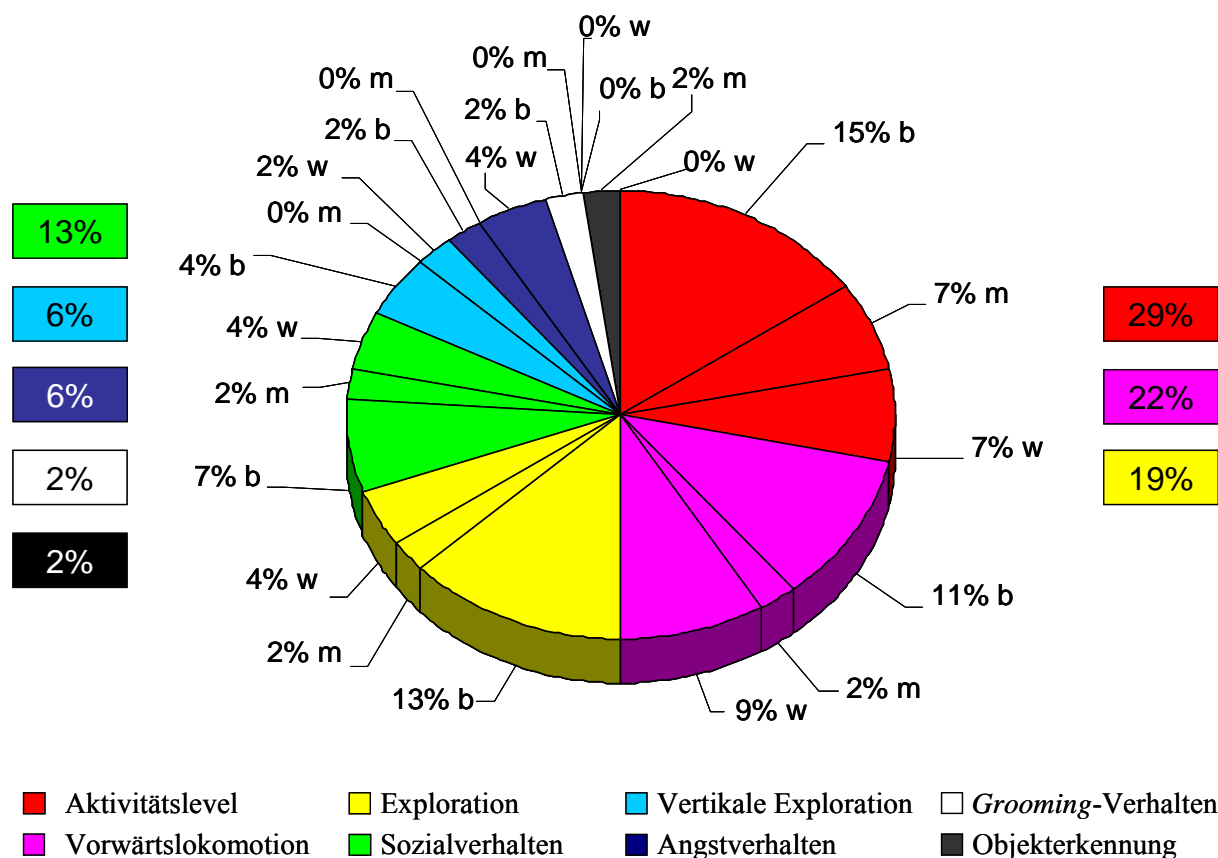


**Abbildung 17: Verhaltensanalyse von 62 Mauslinien (ML) im modified Hole Board (mHB) als Primärscreen der GMC:** %-Anteil der ML mit und ohne signifikante Änderungen der mHB Parameter (a); ML mit veränderten mHB Parametern eingeteilt nach %-Anteil der ML mit primärem Phänotyp und %-Anteil der ML mit subtilen Änderungen im mHB (b); ML mit im mHB detektiertem Phänotyp eingeteilt nach %-Anteil der ML mit geschlechtsunabhängigem Phänotyp und %-Anteil der ML mit Phänotypendetektion nur in Männchen bzw. nur in Weibchen; %-Anteil der ML aus (c) für die detaillierte Verhaltensanalysen als sinnvoll erachtet wurden.

Aus der qualitativen Einteilung der Mauslinien (**Tab. 1 und Abb. 18**) mit primärem Phänotyp entsprechend der mHB-Analysen resultierte, dass die Hälfte der Phänotypen mit veränderten Aktivitätsleveln (29%) und veränderter Vorwärtslokomotion waren (22%). Veränderungen im Explorationsverhalten wurden in 19% und im Sozialverhalten in 13% der Fälle diagnostiziert. Die restlichen 16% verteilten sich auf Phänotypen mit einer Präsenz von 6% und darunter: Veränderungen der vertikalen Exploration (6%), des Angst- (6%) und *Grooming*-Verhaltens (2%) sowie in der Objekterkennung (2%).

Geschlechtsspezifische Anteile an den Phänotypenklassen wurden mit je einer Präsenz von 50% in den Phänotypenklassen der Vorwärtslokomotion, des Aktivitätslevels und des Sozialverhaltens festgestellt. Veränderungen in der Exploration waren mit insgesamt 6% zu etwa  $\frac{1}{3}$  geschlechtsabhängig. Die restlichen Phänotypenklassen – vertikale Exploration, Angst-, *Grooming*-Verhalten und Objekterkennung – wurden aufgrund ihrer geringen Präsenz von 6% und darunter zusammengenommen (in Summe 16%) und lieferten eine Aufteilung von geschlechtsunabhängigen zu –abhängigen Phänotypen im Verhältnis von 1:1.

<b>Tabelle 1: Einteilung der im mHB analysierten Mauslinien (ML), die einen primären Phänotyp lieferten (n = 46), in Phänotypenklassen. <u>ML</u> mit bereits bekanntem plus im mHB zusätzlich ermitteltem Phänotyp. <u>ML</u> bei der nur Weibchen analysiert wurden.</b>			
<b>Phänotypenklassen</b>	<b>In beiden Geschlechtern</b>	<b>Nur in Männchen</b>	<b>Nur in Weibchen</b>
Vorwärtslokomotion	ABE1, KTA041, A008A01, FOXP2, MTO1-G019A03	ABE2	Dkk3, Dll1, Fin13, Tp53
Vertikale Exploration	ATE1, Insl5		Miz1
Aktivitätslevel	<u>Aga002</u> , Megane, Sip, Popdc2, ALI35, ALI018, <u>Ts43H</u>	Ali27, Ali22, Cin85	MCHR1, Eyl, <u>ABE12</u>
Exploration	ABE17, Sepp, Trm1, GLUT8, <u>CRHR1</u> , Eps8	Ptdsr	mPtpg, Drasic
Angstverhalten	Surfl		MFP2, Cs7
<i>Grooming</i> -Verhalten	Arl4		
Sozialverhalten	<u>Ncam</u> , <u>PWD/PH</u> , C3H sehend	Vimentin	Ncdn, Elastin
Objekterkennung		ATE2	
<b>Gesamtzahl ML mit deutlichem Phänotyp</b>	<b>25 (55 %)</b>	<b>7 (15 %)</b>	<b>14 (30 %)</b>



**Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der Phänotypenklassen der Mauslinien (ML) mit einem primären Phänotyp (n = 46) im mHB:** Die sechs Phänotypenklassen sind im Uhrzeigersinn nach absteigendem %-Anteil in je unterschiedlichen Farbcodes dargestellt und in geschlechtsspezifische bzw. -unspezifische %-Anteile am jeweiligen Phänotyp unterteilt. b ≡ Phänotyp in beiden Geschlechtern; m ≡ Phänotyp nur in Männchen; w ≡ Phänotyp nur in Weibchen.



### 2.3.3 Vom Primär- zum Sekundär-/Tertiärscreen: Verhaltensanalyse der Gene-Trap Mauslinie W04406 (Neurochondrin)

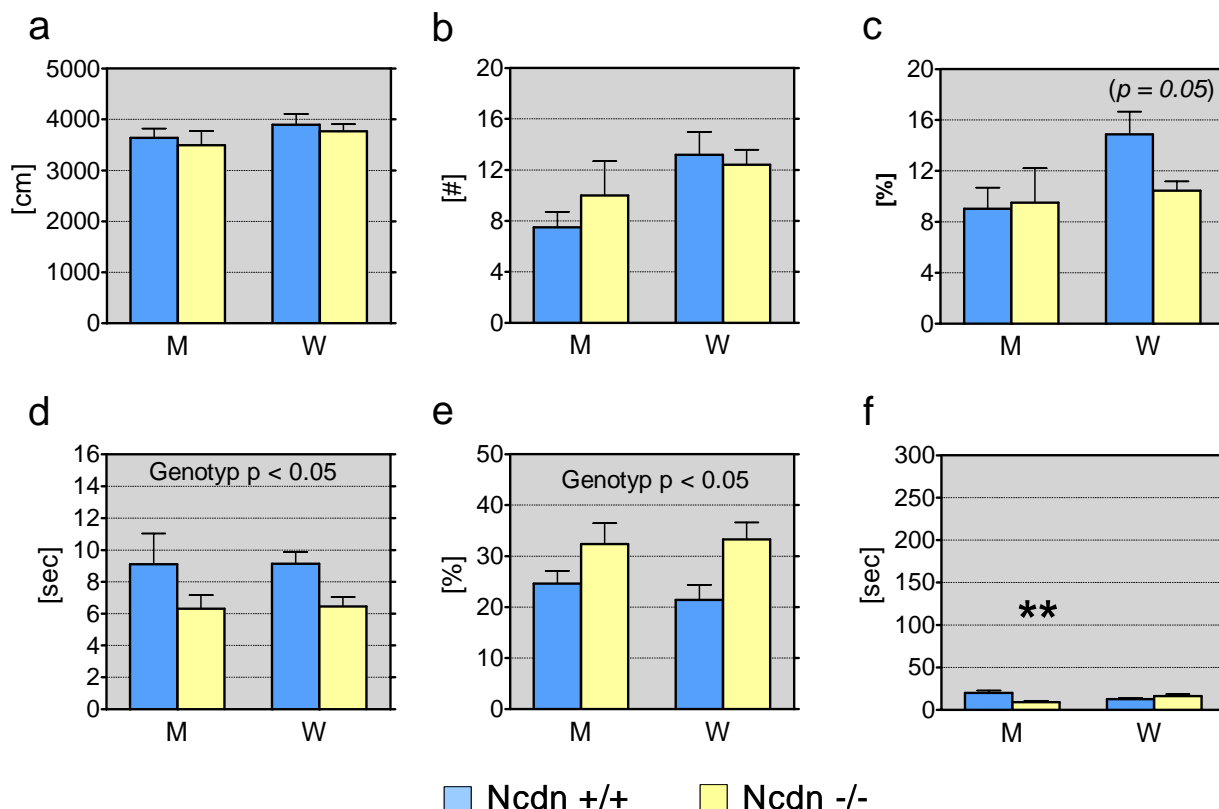
#### *Modified Hole Board*

A) *Reproduktion der Primärphänotypisierung: Gruppenhaltung und mHB-Gruppentestung*

*Vorwärtslokomotion:* Ncdn -/- Mäuse beider Geschlechter legten die gleiche Strecke zurück wie die Kontrollen (**Abb. 19a**).

*Angstkorreliertes Verhalten:* Ncdn -/- Mäuse beider Geschlechter frequentierten das *Board* genauso oft wie die Kontrollen (**Abb. 19b**) und unterschieden sich auch in der auf dem *Board* verbrachten Zeit nicht von ihnen (**Abb. 19c**). Der maximale *Board*-Aufenthalt war bei Ncdn -/- Mäusen beider Geschlechter erniedrigt ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 19d**). Betrachtete man nur die Weibchen, so zeigte sich, dass Ncdn -/- Weibchen *tendenziell* ( $p = 0.05$ ) kürzer auf dem *Board* blieben als Kontrollweibchen.

*Soziale Affinität:* Ncdn -/- Mäuse beider Geschlechter verbrachten mehr Zeit mit sozialen Kontakt als die Kontrollen ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 19e**). Geschlechtsspezifisch ( $p < 0.01$ ) machten Ncdn -/- Männchen frühere Kontakte zur sozialen Gruppe als Ncdn Kontrollmännchen ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 18f**).



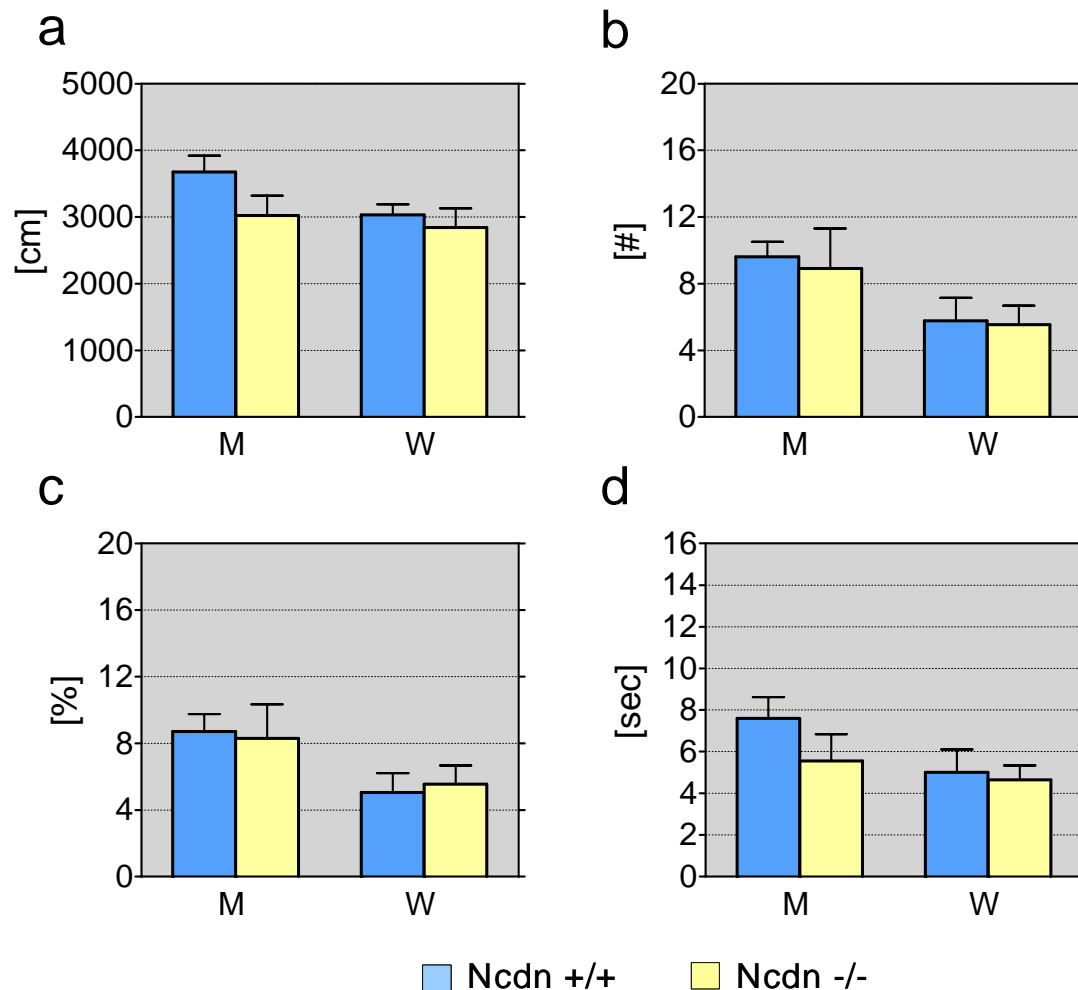
**Abbildung 19: Reproduktion des primären Angst- bzw. Sozialverhalten-Phänotyps im mHB bei gruppengehaltenen Neurochondrin (*Ncdn*) knockout Mäusen - Gruppenhaltung und mHB-Gruppentestung: Lokomotorische Aktivität: gelaufene Distanz (a); angstkorreliertes Verhalten mit den *Board*-Eintritten (b) und dort verbrachter Zeit durchschnittlichen (c) sowie maximalen Zeit (d); Soziale Affinität mit im sozialen Kontakt verbrachten Zeit (e) und Latenz zum ersten Sozialkontakt (f). Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt, n = 9-10. Genotypenunterschiede sind als Text dargestellt - Genotyp  $p < 0.05$ . Geschlechtsspezifische Genotypenunterschiede sind mit Sternchen versehen - \*\*  $p < 0.01$  -/- vs. +/+. ( $p = 0.05$ ) für Analyse ohne Männchen nur innerhalb der Weibchen. M = Männchen; W = Weibchen.**

### B) Einfluss der Einzelhaltung auf den Primärphänotyp: Einzelhaltung und mHB-Einzeltestung

**Vorwärtslokomotion:** *Ncdn* -/- Mäuse beider Geschlechter legten die gleiche Distanz wie *Ncdn* +/+ zurück (**Abb. 20a**).

**Angstkorreliertes Verhalten:** Sowohl die Eintritte auf das *Board* (**Abb. 20b**) als auch die auf dem *Board* verbrachte durchschnittliche und maximale Zeit (**Abb. 20c, d**) unterschieden sich bei *Ncdn* -/- Mäusen beider Geschlechtern nicht von den Kontrollen.

*Soziale Affinität:* - wird bei mHB-Einzeltestung nicht bestimmt, da kein Gruppenkompartiment vorhanden ist.



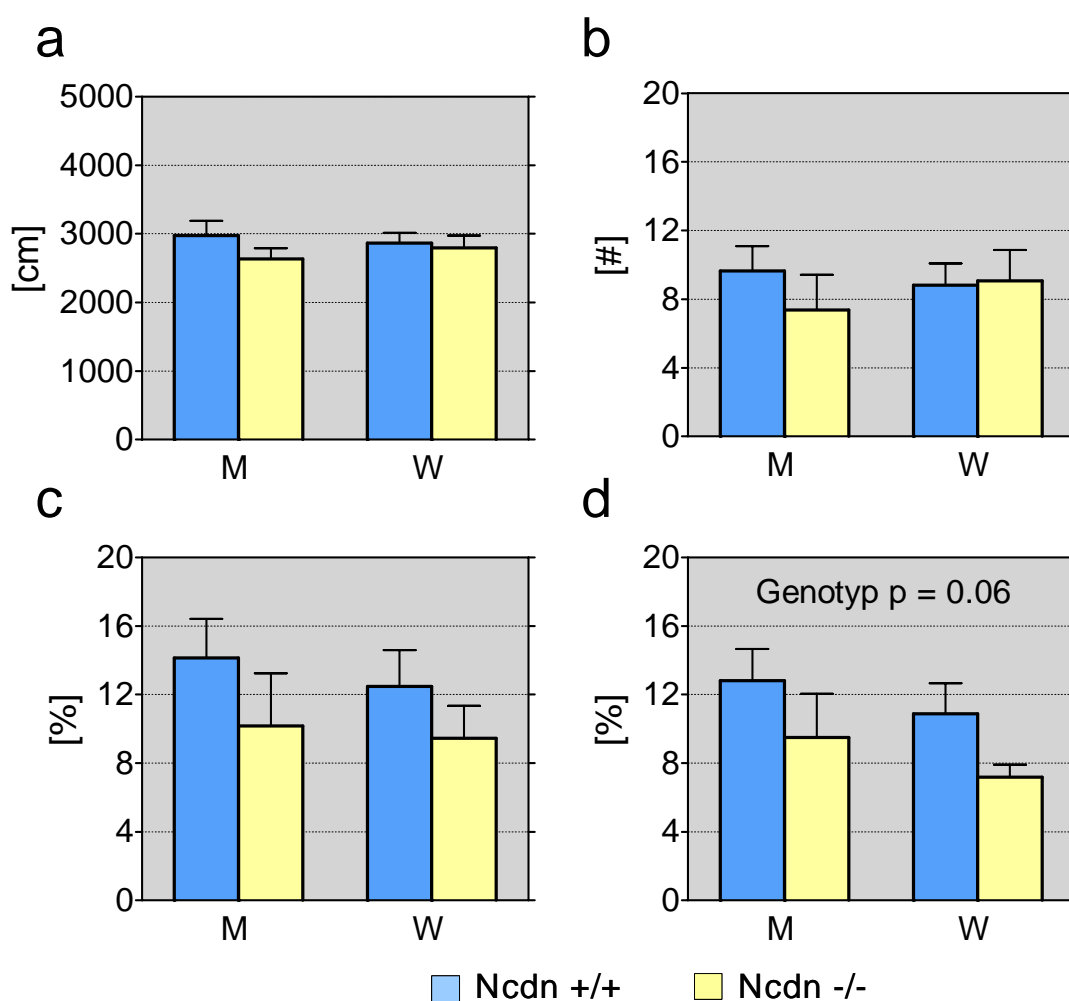
**Abbildung 20: Einfluss der Einzelhaltung auf den Angstphänotyp bzw. Sozialverhaltensphänotyp im mHB bei Neurochondrin (Ncdn) knockout Mäusen - Einzelhaltung und mHB-Einzeltestung: Lokomotorische Aktivität:** gelaufene Distanz (a); angstkorreliertes Verhalten mit den Board-Eintritten (b) und dort verbrachter durchschnittlicher (c) sowie maximaler Zeit (d). Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt, n = 12-13. M = Männchen; W = Weibchen.

C) Einfluss der mHB-Einzeltestung auf den Primärphänotyp: Gruppenhaltung und mHB-Einzeltestung:

*Vorwärtslokomotion:* Ncdn -/- Mäuse beider Geschlechter legten die gleiche Distanz wie Ncdn +/+ zurück (Abb. 21a).

*Angstkorreliertes Verhalten:* Ncdn -/- Mäuse beider Geschlechter unterschieden sich in ihrer Anzahl der *Board*-Eintritte (**Abb. 21b**) und auf dem *Board* verbrachten Zeit (**Abb. 21c**) nicht von den Kontrollen, zeigten aber *tendenziell* kürzere maximale Aufenthaltsdauer auf dem *Board* ( $p = 0.06$ ) (**Abb. 21d**).

[*Soziale Affinität:* bei mHB-Einzeltestung nicht bestimmt, da kein Gruppenkompartiment vorhanden ist.]



**Abbildung 21: Einfluss sozialer Deprivation auf den Angstphänotyp (bzw. Sozialverhaltensphänotyp) von Neurochondrin (Ncdn) knockout Mäusen - Gruppenhaltung und mHB-Einzeltestung:** Lokomotorische Aktivität: gelaufene Distanz (a); angstkorreliertes Verhalten mit den *Board*-Eintritten (b) und dort verbrachter durchschnittlicher (c) sowie maximaler Zeit (d). Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt,  $n = 8-17$ . *Genotypenunterschiede* sind als Text dargestellt - Genotyp  $p = 0.06$ . M = Männchen; W = Weibchen.

### *Elevated Plus Maze*

Da sich in keinem der untersuchten *Elevated Plus Maze*-Parameter eine signifikante *Geschlecht x Genotyp* Interaktion ergab, wurden die Daten der Männchen und Weibchen in den Abbildungen gepoolt.

#### A) *Ncdn* Mäuse in Gruppenhaltung

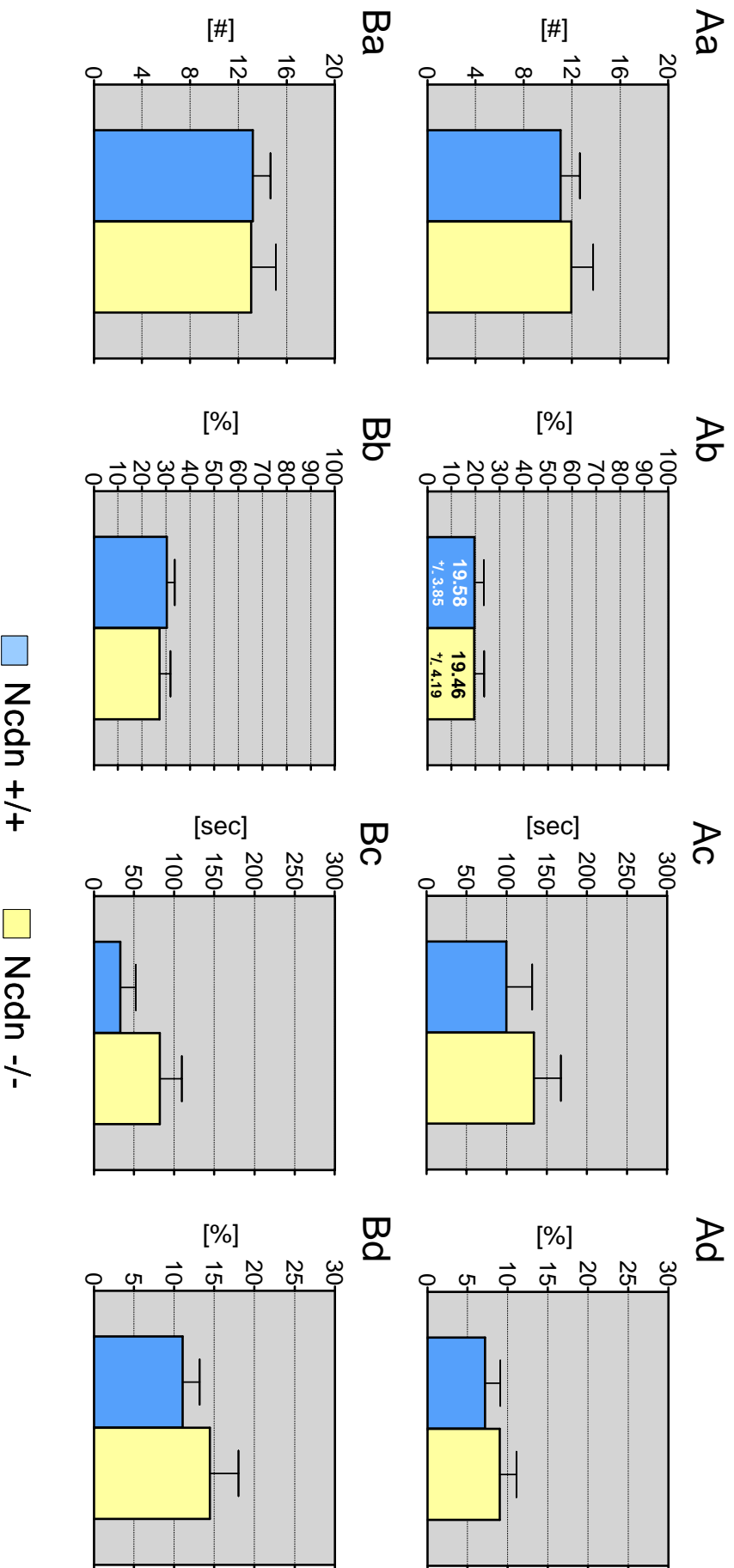
*Aktivität:* *Ncdn* -/- Mäuse beider Geschlechter waren im EPM gleich aktiv wie die Kontrollen, da sie die gleiche Anzahl an gesamten Armeintritten zeigten (**Abb. 22 Aa**).

*Angstkorreliertes Verhalten:* Das Verhalten in Richtung der offenen Arme war sowohl bei Männchen wie auch bei Weibchen unabhängig vom Genotyp (**Abb. 22 Ab-Ad**): *Ncdn* -/- Mäusen betraten prozentual die offenen Arme genauso oft wie die Kontrollen und mit gleicher Latenz zum ersten Eintritt. Sie verbrachten auf den offenen Armen die gleiche Zeit wie die Kontrollen.

#### B) *Ncdn* Mäuse in Einzelhaltung

*Aktivität:* *Ncdn* -/- beider Geschlechter unterschieden sich nicht in ihrer Aktivität, gemessen an den gesamten Armeintritten, von den Kontrollen (**Abb. 22 Ba**).

*Angstkorreliertes Verhalten:* Der prozentuale Anteil der Eintritte in die offenen Armen sowie die Latenz zum ersten Betreten eines offenen Arms war bei *Ncdn* Mutanten beider Geschlechter gleich wie bei den Kontrollen (**Abb. 22 Bb-Bc**). Gleiches galt für die Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen (**Abb. 22 Bd**).



### *Light Dark Box*

Da sich nur in einem der *Light Dark Box*-Parameter eine signifikante *Geschlecht x Genotyp* Interaktion ergab, in den restlichen aber nicht, wurden abgesehen von dieser Ausnahme die Daten der Männchen und Weibchen in den Abbildungen gepoolt.

#### A) *Ncdn Mäuse in Gruppenhaltung*

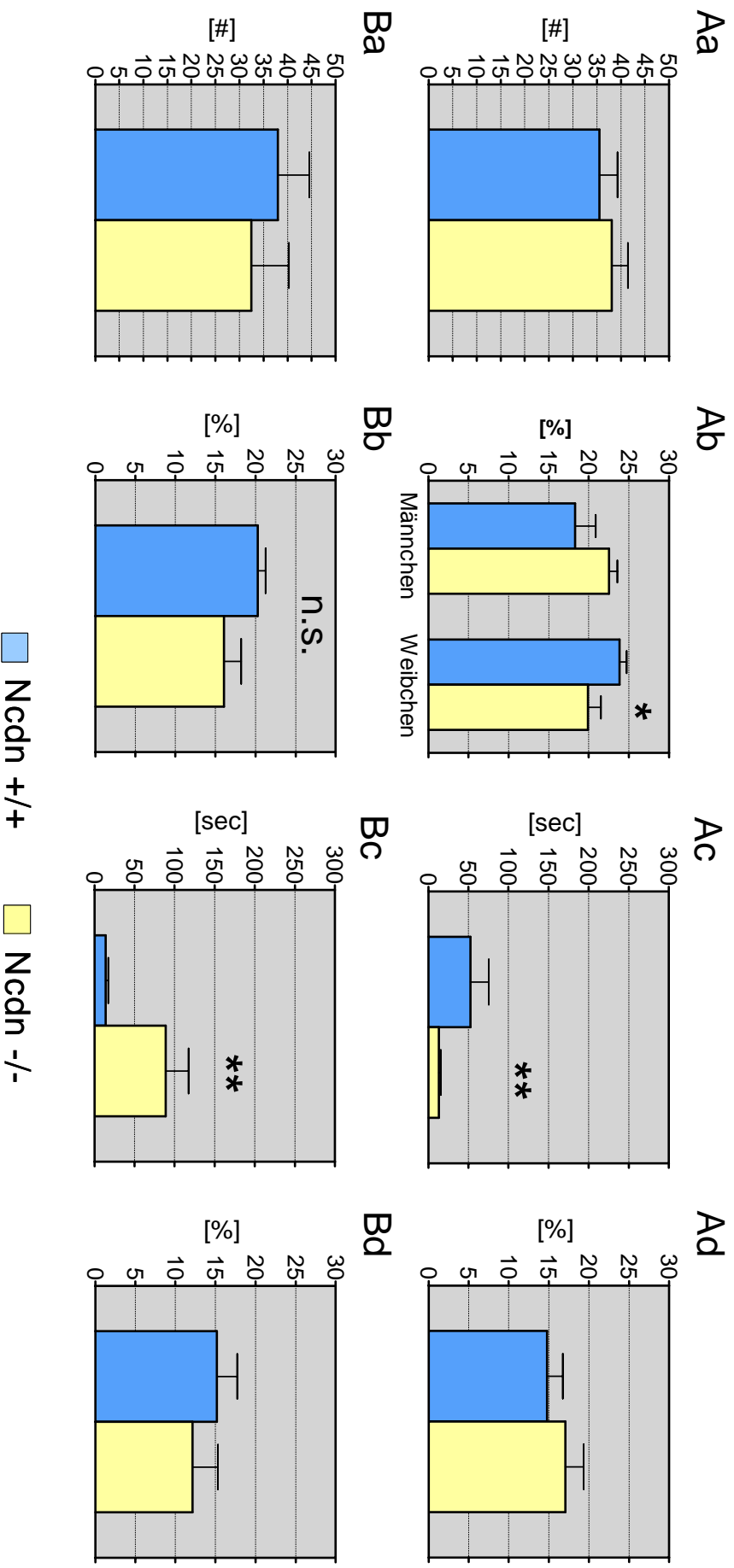
*Aktivität:* Gruppengehaltene *Ncdn -/-* Mäuse beider Geschlechter machten - ermittelt über alle drei Kompartimente - gleich viele Eintritte wie die Kontrollen (**Abb. 23 Aa**).

*Angstkorreliertes Verhalten:* Der prozentuale Anteil der Eintritte in das helle Kompartiment war geschlechtsspezifisch ( $p < 0.05$ ) in *Ncdn -/-* Weibchen im Vergleich zu Kontrollweibchen reduziert ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 23 Ab**). Dabei betreten *Ncdn -/-* Mäuse beider Geschlechter das helle Kompartiment mit niedrigerer Latenz, verbrachten dort aber gleichviel Zeit wie die Kontrollen (**Abb. 23 Ac, Ad**).

#### B) *Ncdn Mäuse in Einzelhaltung*

*Aktivität:* Die Aktivität gemessen anhand der Eintritte in alle drei Kompartimente war bei *Ncdn -/-* Mäusen beider Geschlechter gleich den Eintritten der Kontrollen (**Abb. 23 Ba**).

*Angstkorreliertes Verhalten:* *Ncdn -/-* Mäuse beider Geschlechter machten prozentual gleich viele Eintritte in das helle Kompartiment wie die Kontrollen (**Abb. 23 Bb**), betreten das helle Kompartiment aber früher ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 23 Bc**). Die im hellen Kompartiment verbrachte Zeit von *Ncdn -/-* Mäusen beider Geschlechter unterschied sich nicht von der der Kontrollen (**Abb. 23 Bd**).



**Abbildung 23: Light Dark Box Performance der Neurochondrin (*Ncdn*) knockout Mäuse in Gruppen- (A) und Einzelhaltung (B): Lokomotorische Aktivität: gesamte Anzahl der Eintritt in alle drei Kompartimente (a); angstkorreliertes Verhalten mit Prozent der Eintritte (b) und Latenz zum ersten Eintritt in das helle Kompartiment (c) sowie Zeit im hellen Kompartiment (d). Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt, (A) *Ncdn*  $+/+$  n = 19, *Ncdn*  $-/-$  n = 19, (B) *Ncdn*  $+/+$  n = 15, *Ncdn*  $-/-$  n = 19; \*\* p < 0.01  $-/-$  vs.  $+/+$ .**



***Social Interaction***

A) *Ncdn Mäuse in Gruppenhaltung*

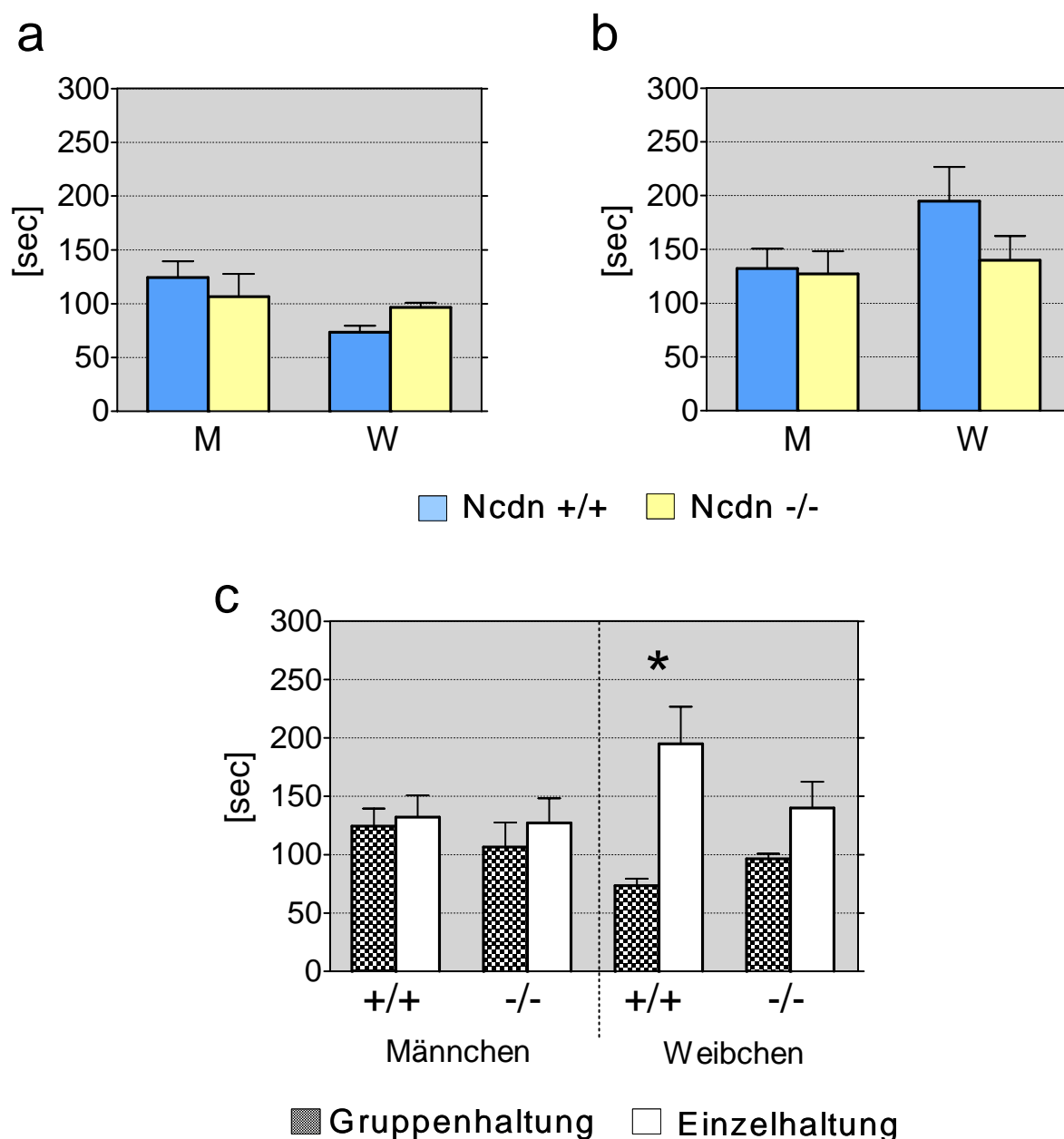
Gruppengehaltene Ncdn Mäuse beider Geschlechter verbrachten unabhängig vom Genotyp gleich viel Zeit mit aktiver sozialer Interaktion (**Abb. 24a**).

B) *Ncdn Mäuse in Einzelhaltung*

Einzelgehaltene Ncdn Mäuse beider Geschlechter verbrachten die gleiche Dauer in sozialer Interaktion wie Kontrollen (**Abb. 24b**).

C) *Social Interaction bei Ncdn Mäusen in Abhängigkeit der Haltungsbedingungen*

Haltungsbedingungen beeinflussten je nach Geschlecht ( $p < 0.01$ ) die mit aktiver sozialer Interaktion verbrachte Zeit (**Abb. 24c**). Einzelgehaltene Ncdn Männchen verbrachten gleich viel Zeit mit aktiver sozialer Interaktion wie gruppengehaltene, und das galt für beide Genotypen. Bei Ncdn Weibchen war die Interaktion mit dem Artgenossen abhängig von den Haltungsbedingungen und dem Genotyp ( $p < 0.01$ ): Ncdn +/+ Weibchen verbrachten mehr Zeit mit sozialer Interaktion, wenn sie sozial depriviert gehalten wurden ( $p < 0.05$ ), Ncdn -/- modulierten die in sozialer Interaktion verbrachte Zeit nicht signifikant mit den Haltungsbedingungen.



**Abbildung 24: Social Interaction von gruppen- und einzelgehaltenen Neurochondrin (Ncdn) knockout Mäusen in Abhängigkeit der Haltungsbedingungen:** dargestellt ist jeweils die Zeit, die mit aktiver sozialer Interaktion verbracht wurde, bei Gruppenhaltung (a) und Einzelhaltung (b). In (c) sind die gleichen Daten dargestellt und ausgewertet in Abhängigkeit der Haltungsbedingungen (c). Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt, (a) Ncdn +/+ n = 13, Ncdn -/- n = 7-12, (b) Ncdn +/+ n = 4-6, Ncdn -/- n = 6; \* p < 0.05 Gruppenhaltung vs. Einzelhaltung.

---

*Social Discrimination und Test zur Wahrnehmung des Geruchs eines Artgenossen*

*A) Social Discrimination bei gruppengehaltenen Ncdn Mäusen*

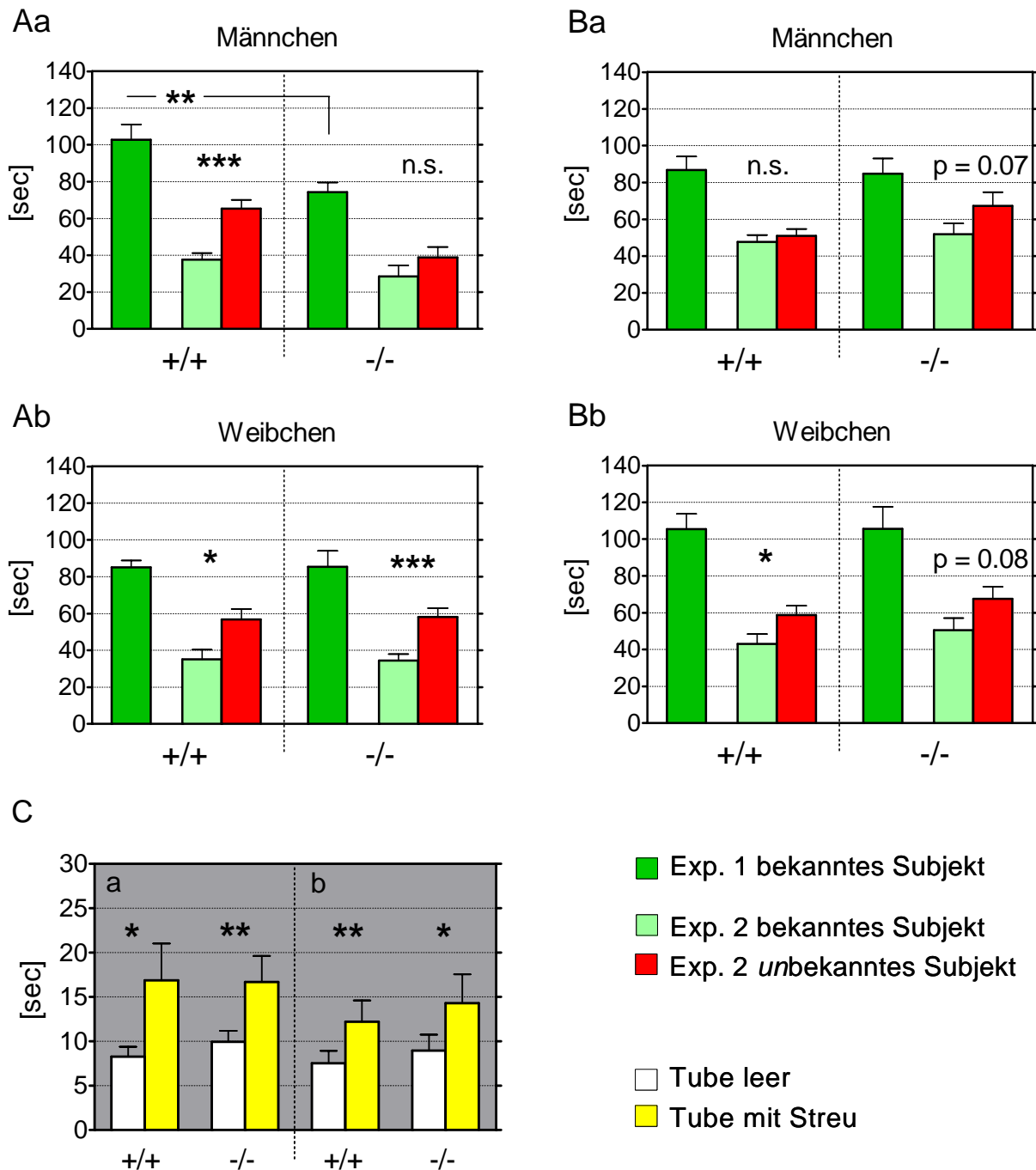
Gruppengehaltene (**Abb. 25 Aa-b**) Ncdn Kontrollen beider Geschlechter unterschieden zwischen bekanntem und unbekanntem Subjekt, da sie mehr Zeit mit der Exploration des unbekanntes Artgenossen verbrachten (Männchen  $p < 0.001$ , Weibchen  $p < 0.05$ ). Bei den Ncdn Mutanten diskriminierten die Weibchen ( $p < 0.001$ ), nicht aber die Männchen. Ncdn -/- Männchen waren im Vergleich zu den Kontrollmännchen weniger aktiv während des Tests, wie das niedrigere Explorationsniveau der ersten Exploration zeigte ( $p < 0.01$ ); in Weibchen war dies nicht der Fall.

*B) Social Discrimination bei einzelgehaltenen Ncdn Mäusen*

In Einzelhaltung (**Abb. 25 Ba-b**) diskriminierten nur die Ncdn Kontrollweibchen signifikant ( $p < 0.05$ ). Ncdn Kontrollmännchen diskriminierten nicht und Ncdn Mutanten beider Geschlechter *tendenziell* (Männchen  $p = 0.07$ , Weibchen  $p = 0.08$ ).

*C) Test zur Wahrnehmung des Geruchs eines Artgenossen*

Sowohl Ncdn Männchen als auch Weibchen beider Genotypen konnten den Duft des Artgenossen wahrnehmen (**Abb. 25 Ca-b**): Sie verbrachten signifikant mehr Zeit am Tube mit als am Tube ohne Duftstoffe (Männchen:  $+/+$   $p < 0.05$ ,  $-/-$   $p < 0.01$ ; Weibchen:  $+/+$   $p < 0.01$ ,  $-/-$   $p < 0.05$ ).



**Abbildung 25: Social Discrimination (A, B) und Geruchsdiskrimination (C) bei Neurochondrin (Ncdn) ko Mäusen:** (A, B) Explorationszeit während der zweiten Exposition (Exp. 2) eines aus erster Exposition (Exp. 1) bekannten und eines unbekanntes Subjektes bei gruppengehaltenen Ncdn Männchen (Aa) sowie Weibchen (Ab) und von in Einzelhaltung gehaltenen Ncdn Männchen (Ba) sowie Weibchen (Bb). (C) Explorationszeit an Tubes ohne Duftstoffe (Tube leer) und mit Duftstoffen eines unbekanntes Artgenossen (Tube mit Streu) in Ncdn Männchen (a) und Weibchen (b). Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt, (A, B)  $n = 12-13$  und (C)  $n = 10$  pro Genotyp und Geschlecht. (A, B) Signifikanzen \*  $p < 0.05$  bzw. \*\*\*  $p < 0.001$  und Tendenzen mit  $p = 0.07$  bzw.  $p = 0.08$  bekanntes vs. unbekanntes Subjekt; \*\*  $p < 0.01$  Exp. 1 +/+ Männchen vs. Exp. 1 -/- Männchen; (C) \*  $p < 0.05$  bzw. \*\*  $p < 0.01$  -/- vs. +/+.

### 3 DISKUSSION

Mit gentechnischen Methoden hergestellte mutante Mauslinien sind ein hervorragendes Werkzeug, um molekulare Signalwege bestimmter Verhaltensweisen zu erforschen. Die Verhaltensphänotypisierung der mutanten Linien sollte dabei möglichst *umfassend* und *reproduzierbar* sein. Ferner sollte sie mit der Phänotypisierung des gesamten Organismus verbunden sein. Für eine *umfassende* und *reproduzierbare* primäre Verhaltensphänotypisierung innerhalb der GMC (Gailus-Durner et al. 2005) wurde der *modified Hole Board* Test adaptiert. Dieser Test ermöglicht die Erfassung mehrerer Verhaltensdimensionen in nur einer einzigen kurzen Beobachtungssession (Ohl et al. 2001a).

Das mHB ist bereits in Ratten und Mäusen etabliert und wird als high-throughput Methode propagiert (Ohl and Keck 2003). Dennoch musste sichergestellt werden, dass es im eigenen Labor anwendbar ist sowie eine valide Datenerfassung ermöglicht. So sollten z.B. bereits publizierte Verhaltensphänotypen im mHB reproduziert werden können. Die Re-Überprüfung der Anwendbarkeit ist berechtigt, da Verhaltensphänotypen auf komplexen genetischen Interaktionen beruhen, die von der Umwelt deutlich mitgeprägt werden (Hamer 2002). Das Labor mit den Experimentbedingungen stellt eine solche Umwelt dar, deren Wirkung auf Phänotypisierungsdaten es zu kennen gilt.

Daher beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit der Validierung des mHBs innerhalb des Verhaltensmoduls der GMC. Sie gliederte sich in drei Abschnitte: (1) Wirkung des mHB-Testsystems auf die Verhaltensprofile (*Baselines*) der Mäuse von Inzuchtstämmen, (2) Erfassen der Auswirkung der GMC-Haltungsbedingungen auf diese *Baselines* sowie Überprüfung, ob mögliche Effekte testspezifisch sind und (3) Evaluierung der Nützlichkeit des mHBs innerhalb des Primärscreens bezüglich (a) Bestätigung bekannter und (b) Detektion neuer Phänotypen im mHB bei mutanten Linien/Stämmen. An einer mutanten Linie wurden exemplarisch über den Primärscreen hinaus auch die Folgeuntersuchungen detailliert dargestellt (c). Abschließend sollte anhand der eigenen Datenlage beurteilt werden, ob der mHB Test valide Daten liefern und damit erfolgreich im Verhaltensscreen etabliert werden konnte.

### 3.1 Teil 1: Validierung des modified Hole Boards

Zur Erfassung des Lokomotions- sowie Angstverhaltens bei Nagern wurde bis dato meistens der *Open Field Test* (Crawley 1999a) benutzt. Obwohl auch das mHB Informationen über das Lokomotions- sowie Angstverhaltens liefert, ist es in Publikationen seltener zu finden. Letzteres mag sicher daran liegen, dass das mHB neuer ist. Da beide Tests von der Konzeption her unterschiedlich sind, stellte sich die Frage, ob *Baselines* für Lokomotion und Angstverhalten aus beiden Tests miteinander verglichen werden können und welchen Einfluss das *Board* auf die *Baselines* hat. Hierzu wurden Mäuse beider Geschlechter der C3HeB/FeJ und C57BL/6J Stämmen untersucht. Da C3H Mäuse erblinden (Chang et al. 2002), wurde ferner der Einfluss von Blindheit auf unkonditioniertes Verhalten im mHB Test bestimmt.

#### 3.1.1 mHB erhöht Lokomotion und beeinflusst Angstparameter

Im Vergleich zum OF erhöhte das mHB die Lokomotion beider Stämme. Dieser Effekt war bei C3H ausgeprägter als bei B6J. Dass B6J eine niedrigere Steigerung der Lokomotion zeigte als C3H, mag darin begründet sein, dass B6 im Vergleich zu anderen Stämmen eine hohe lokomotorische Aktivität zeigen (DeFries et al. 1978; Logue et al. 1997; Bolivar et al. 2000). Folglich wäre der gleiche Anstieg der Lokomotion wie bei C3H im mHB aufgrund der schon hohen Grundaktivität schwieriger gewesen. Da das mHB doppelt so groß ist wie das benutzte OF, also mehr Fläche zum Explorieren bietet, kann die erhöhte Lokomotion im mHB als Folge einer größeren Testfläche angesehen werden. Diese Annahme steht in Einklang mit Studien, die zeigen, dass die Lokomotion bei Mäusen mit steigender OF-Größe zunimmt (Nagy and Forrest 1970; Blizard 1971; Krsiak and Janku 1971). Inwieweit die zusätzlichen konzeptionellen Unterschiede zwischen dem mHB und dem OF zur Steigerung der Lokomotion beigetragen haben, kann mit diesem Versuchsansatz nicht beurteilt werden.

Beide Tests führten hinsichtlich der lokomotorischen Aktivität zur selben Aussage: C3H Männchen waren ebenso aktiv wie C3H Weibchen und B6J Männchen weniger aktiv als B6J Weibchen. Dies legte nahe, dass unter den gegebenen Laborbedingungen und Testprotokollen die Lokomotion der Mäuse in beiden Tests miteinander vergleichbar ist.

In der Literatur ist die Datenlage bezüglich der Lokomotion dieser Stämme und Geschlechter in einem fünf Minuten *Open Field Test* widersprüchlich. So sind C3H Männchen aktiver als C3H Weibchen und B6J Männchen gleich aktiv wie B6J Weibchen beschrieben (Bolivar et al. 2000). Andererseits sind auch in *beiden* Stämmen keine Unterschiede zwischen den

Geschlechtern in der vorwärtsgerichteten Lokomotion bekannt (Logue et al. 1997). Ein Grund für diese Differenzen der Daten sind die (extremen) Unterschiede der Testaufbauten und – handhabungen, da biologische Messwerte durch Unterschiede in der Prozedur beeinflusst werden können (Champy et al. 2004). Während in *dieser Studie* die Mäuse direkt vom Heimkäfig ins moderat beleuchtete OF an die Wand gesetzt wurden, bestimmten *Bolivar et al.* erst das Gewicht, setzten die Mäuse dann für 5 min in einen neuen Käfig und platzierten sie anschließend in die Mitte des in einer nicht beleuchteten, aber geräuschgedämpften Box platzierten *Open Fields*, *Logue et al.* starteten die Versuche gleich, benutzten jedoch eine runde Arena mit heller Beleuchtung.

Im Vergleich zur Lokomotion wurden die Angstparameter beider Tests stammspezifisch beeinflusst. Im C3H Stamm waren die *Baselines* für die „Anzahl der Eintritte“ und „Latenz zum ersten Eintritt“ in den aversiven Bereich im mHB gleich wie im OF. Im B6J Stamm reduzierte der mHB Test diese *Baselines* in beiden Geschlechtern (weniger und spätere Eintritte), bei Männchen aber stärker als bei Weibchen.

Die Tatsache, dass das mHB die im „Zentrum verbrachte Zeit“ bei C3H erhöhte, legte nahe, dass C3H im mHB weniger ängstlich als im OF sind. Dieser Befund steht im Einklang mit dem Anspruch des mHBs, für das Testtier – bedingt durch den möglichen Kontakt zur sozialen Gruppe während der Testsituation im Vergleich zur Testung ohne sozialen Kontakt – weniger stressvoll zu sein (Ohl et al. 2001a). Dabei zeigten C3H Männchen im Vergleich zu Weibchen im OF keinen Unterschied im Angstverhalten, waren aber im mHB weniger ängstlich als diese. Dieses zeigte erstens, dass die Detektion von Geschlechtsunterschieden im Angstverhalten bei C3H Mäusen von der Testsituation abhängt. Und zweitens, dass Informationen über Angstverhalten in diesen Tests nicht direkt miteinander verglichen werden können, da die Testsituationen unterschiedlich sind. Das Angstprofil von B6J Mäusen unterstützte diese Schlussfolgerungen: Im OF waren B6J Männchen *tendenziell* weniger ängstlich (mehr Zeit im Zentrum) als B6J Weibchen, im mHB signifikant mehr (weniger Zeit im Zentrum). Da diese *Baselines* bei B6J Weibchen in beiden Testsituationen gleich hoch waren, legte dies nahe, dass B6J Weibchen nicht so sensitiv wie B6J Männchen auf die Unterschiede der Testsituationen reagieren.

Schon bekannte stamm- und testspezifische Geschlechtsunterschiede (Voikar et al. 2001) und die hier ermittelten zeigen, wie wichtig es ist, die Interaktionen der Faktoren Stamm, Geschlecht und Test im eigenen Labor zu kennen. Diese Kenntnis fundiert eine valide

Verhaltensphänotypisierung. So können auf solchen Grundlagenuntersuchungen basierende Daten von mutanten Mauslinien besser eingeordnet und beurteilt werden, als ohne das Wissen um z.B. testspezifische Geschlechtsunterschiede bestimmter Verhaltensdimensionen. Daher ist es notwendig, dass Informationen über geschlechtsspezifische Unterschiede standardmäßig erfasst und berichtet werden.

Dass sich bestimmte Verhaltensdimensionen der Mäuse je nach Testsituation ändern (hier Angstverhalten) oder auch nicht (hier Lokomotion), ist zudem positiv zu bewerten. Denn es bedeutet, dass ein erweiterter Einblick in das Verhaltensprofil einer mutanten Mauslinie möglich ist, wenn die Tiere *unterschiedliche* Verhaltenstests durchlaufen. In der Praxis heißt dies, dass zur umfassenden Charakterisierung z.B. des Angstverhaltens verschiedene Angsttests möglichst unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt werden sollten. Damit eine Reproduktion der Daten nicht gefährdet wird, sollten diese Bedingungen allerdings kontrolliert/bewußt gewählt werden. Der Nachteil liegt allerdings in der zeitlichen und finanziell aufwendigeren Durchführung solcher Untersuchungen.

### **3.1.2 Das *Board* – Physikalische Beschaffenheit des Zentrums verändert Angstparameter**

Die bereits diskutierten Unterschiede der *Baselines* der Angstparameter „Anzahl der Eintritte“ und „Latenz zum ersten Eintritt“ zwischen mHB und OF beruhten hauptsächlich auf Effekten der Zentrumbeschaffenheit – das physisch detektierbare *Board* im mHB vs. physisch nicht detektierbarem Zentrum im OF.

Diese Interpretation gründet sich auf Ergebnisse der Untersuchungen dieser Parameter im mHB mit und ohne *Board*: 1) Das *Board* reduzierte die Frequentierung des Zentrums in beiden Stämmen. In C3H um ca. 50% auf ein Niveau, das dem der Eintritte ins OF-Zentrum entsprach. In B6J reduzierte das *Board* die Eintritte von einem OF-ähnlichen Niveau ( $\bar{x}$  22 mHB ohne *Board* vs.  $\bar{x}$  28 OF) um 35% bei B6J Weibchen und um 73% drastisch bei B6J Männchen. 2) Das *Board* erhöhte bei B6J die Latenzen zum ersten Zentrum-Eintritt. Daraus folgte, dass das *Board* die Aktivität hinsichtlich des Zentrums der mHB Arena reduziert und dieser Effekt in B6J deutlich stärker ausgeprägt ist als bei C3H. Letzteres ist wiederum darin zu begründen, dass B6J lokomotorisch sehr aktiv sind.

Die Daten bekräftigten, dass die benutzten Angstparameter „Latenz und Anzahl der Eintritte“ in den aversiven Bereich lokomotionsabhängig sind und zumindest in B6J als sekundäre



Angstparameter angesehen werden sollten. Daher werden in der Literatur z.T. lokomotionsbereinigte Verhaltensparameter verwendet.

Einen spezifischeren Angstparameter stellt die „im Zentrum verbrachte Zeit“ dar, da diese nicht parallel zu den beiden anderen Angstparametern reduziert wurde. Obwohl beide Stämme das mHB-Zentrum mit *Board* seltener und B6J später betraten als das ohne *Board*, verbrachten C3H mit *Board* gleich viel Zeit in der Mitte der Arena, B6J Männchen weniger und B6J Weibchen mehr. Folglich übt das *Board* in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund eine unterschiedliche Attraktivität auf die Geschlechter des B6J Stamms aus. Ergebnisse der Habituationsphase im *Object Recognition* Test zeigen, dass B6J Weibchen Objekte intensiver explorieren als B6J Männchen (K. Weindl, persönliche Kommunikation). Dies würde der Attraktivität des Zentrums mit *Board*, das ein (großes) Objekt darstellte, bei B6J Weibchen gegenüber geringerer Attraktivität des Zentrums ohne *Board* entsprechen. Warum B6J Männchen mit *Board* potentiell ängstlicher reagierten, also weniger Zeit auf dem *Board* verbrachten, bleibt unklar.

### 3.1.3 mHB-Baselines sind geeignet zur Detektion von Genotypenunterschieden

Als Fazit zeigte sich, dass Unterschiede in den im mHB gemessenen *Baselines* für vorwärtsgerichtete Lokomotion und Angstparameter im Vergleich zum OF bestehen. Generell steigert das mHB die Lokomotion. Informationen über Angstverhalten zwischen beiden Paradigmen sind nicht direkt miteinander vergleichbar.

Die *Baselinelevels* für Angstverhalten sind aber im mHB hoch genug, um Unterschiede zwischen Kontrollen und mutanten Mäusen detektieren zu können. Insbesondere begünstigt das mHB bei Mutanten auf C3H Hintergrund die Detektion angstkorrelierter Phänotypen, da dieses Paradigma die im OF niedrigen *Baselines* für „Zeit im Zentrum“ deutlich erhöhte. Diese Erhöhung sollte bei der Analyse von mutanten Mäusen anxiogene Effekte einer Mutation oder pharmakologischen Behandlung im Vergleich zu den Kontrollmäusen eher detektierbar machen.

Zudem legten die Daten nahe, dass das mHB eine größere Sensitivität in der Erfassung von Unterschieden im angstkorrelierten Verhalten aufweist als das OF. Denn im mHB wurden innerhalb beider Stämme Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der „Zeit im Zentrum“ detektiert, im OF nicht.

### 3.1.4 Intakte Sehfähigkeit ermöglicht früheren Gebrauch des Verhaltensrepertoirs

Um den Einfluss von Blindheit auf unkonditioniertes Verhalten im mHB zu untersuchen, wurden C3H/HeH Mäuse mit retinaler Degeneration mit C3H.Pde6b+ Mäusen ohne retinale Degeneration verglichen (Hart et al. 2005).

Die in der *vorliegenden* Arbeit untersuchten C3H.Pde6b+ Mäuse wiesen eine im Vergleich zu C3H/HeH Mäusen histologisch intakte Retina auf. Ferner zeigten sie entsprechend der sich drehenden schwarzen Streifen in der *Optokinetic Drum* – sekundärer Sehtest im Augen-Screen der GMC – eine die Streifen verfolgende Kopfbewegung, was C3H/HeH Mäuse nicht der Fall war (Dr. Claudia Dalke, GMC Presentations C3H sehend, *Eye Screen*).

Die mHB-Analyse zeigte, dass sehende C3H.Pde6b+ Mäuse beider Geschlechter mit der Exploration des mHBs im Vergleich zu blinden C3H/HeH Mäusen früher begannen. Ferner implizierten die Daten, dass männliche C3H.Pde6b+ erniedrigte Lokomotion im Vergleich zu Kontrollmännchen aufweisen. Diese Interpretation ist jedoch nicht ohne Vorbehalt. Es muss in Betracht gezogen werden, dass die Lokomotion bei C3H/HeH Männchen – der Kontrollgruppe – ebenfalls im Vergleich zu beiden Gruppen von Weibchen, C3H.Pde6b+ und C3H/HeH, erhöht war. Somit lassen sich die Daten umgekehrt als erhöhte Aktivität blinder C3H/HeH Männchen interpretieren. Die Annahme der *Hyper*-Lokomotion bei C3H/HeH Männchen gründet sich auf in dieser Arbeit erhobene Daten. Diese zeigten, dass die Lokomotion im mHB bei unter gleichen Bedingungen aufgezogenen und untersuchten C3H Mäusen des C3HeB/FeJ Unterstammes bei ca. 2500 cm für beide Geschlechter lag (vgl. mHB 2.1.1). Die Lokomotion von C3H/HeH *Weibchen* wie auch von C3H.Pde6b+ beider Geschlechter passten mit ca. gelaufenen 2300 cm zur Lokomotion des C3HeB/FeJ Unterstammes. C3H/HeH *Männchen* zeigten hingegen mit ca. 3400 cm gelaufener Distanz eine lokomotorische Aktivität, die die von C57BL/6J Mäusen (2800-3300 cm) im mHB übertraf (vgl. mHB 2.1.1). Dabei gilt der B6 Stamm in der Literatur als sehr aktiv (Kopp et al. 1998; Bolivar et al. 2000), dessen Männchen auch im Vergleich zu Männchen des hier untersuchten C3H/HeH Unterstammes zumindest im OF als *eigentlich aktiver* gelten (Tucci et al. 2006). Alles zusammen spricht dafür, dass im mHB eine *Hyper*-Lokomotion bei C3H/HeH Männchen und nicht eine *Hypo*-Lokomotion bei C3H.Pde6b+ Männchen beobachtet wurde. Die Ursachen dieser *Hyper*-Lokomotion bleiben unklar. Eine detaillierte Verhaltensanalyse weiterer *Batches* von C3H/HeH Mäusen würde zu einer fundierten Aussage beitragen, was über den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit hinausging.

Entsprechend der Lokomotion zeigten sehende C3H.Pde6b+ beider Geschlechter auch andere Verhaltensdimensionen früher. So waren sowohl die vertikale als auch die horizontale Exploration in C3H.Pde6b+ früher zu detektieren, wobei für die vertikale Exploration das Signifikanzniveau nur bei Weibchen erreicht wurde. Ansonsten unterschieden sich sehende und blinde Mäuse im Explorationsverhalten nicht voneinander, da die *Rearing*-Frequenz und der positive Objektindex als Maß einer gelungenen Objekterkennungsleistung gleich waren. Somit kann die kognitive Testkomponente im mHB als unabhängig von der Sehfähigkeit der Mäuse angesehen werden. Dieser Befund entspricht bereits bekannten Untersuchungen. Zwar schneiden sehende Mäuse in, auf intakter Sehfähigkeit beruhenden, kognitiven Tests besser ab als Mäuse mit retinaler Degeneration (Brooks et al. 2005; Wong and Brown 2006; Brown and Wong 2007). Sie heben sich aber im Objekterkennungstest, der auf der Exploration der Objekte mittels des olfaktorischen und somatosensorischen Systems beruht, nicht von blinden C3H ab (Brooks et al. 2005). Diese Arbeiten basieren allerdings auf Vergleichen zwischen sehenden und blinden Stämmen. Entsprechende Befunde in sehenden *und* blinden Mäusen auf C3H Hintergrund sind bisher auf den räumlich-visuellen *Morris Water Maze Test* und Stimulus- sowie kontextabhängiges aversives Lernen begrenzt (Bolivar et al. 2001; Clapcote et al. 2005). Somit wird die im mHB gefundene gleiche Objekterkennungsleistung zwischen C3H.Pde6b+ und C3H/HeH als neuer Befund angesehen. Dieser sollte aber in einem spezifischeren Objekterkennungstest verifiziert werden.

Des Weiteren betraten C3H.Pde6b+ beider Geschlechter das *Board* früher als C3H/HeH, unterschieden sich aber nicht in der *Board*-Aufenthaltsdauer. Dies wurde als geringere Vorsicht gegenüber offenen Flächen bei sehenden Mäusen angesehen - zumindest im mHB Test. Denn sehende C57BL/6J und 129/Sv Mäuse zeigen im *Elevated Plus Maze Test* im Vergleich zu blinden C3H/He erhöhtes angstkorriertes Verhalten (Hagenbuch et al. 2006; Griebel et al. 2000; Brooks et al. 2005). Zudem reagieren sie je nach dem, ob die Wände der geschlossenen Arme der Maze durchsichtig sind oder nicht, mit erniedrigter bzw. erhöhter Bereitschaft, die offenen Arme zu explorieren; für C3H/He ist die Wandbeschaffenheit dabei unerheblich (Hagenbuch et al. 2006). Damit kann die Fähigkeit, die Umgebung visuell erfassen zu können, Angstverhalten je nach Testaufbau unterschiedlich beeinflussen.

Die reduzierte soziale Affinität im mHB bei C3H.Pde6b+ Mäusen stimmte mit ihrer geringeren Vorsicht überein, da der soziale Kontakt während der mHB-Testsituation als wichtiger für ängstliche im Vergleich zu weniger ängstlichen Tiere angesehen wird (Ohl et al. 2001a). Ferner zeigten sehende C3H.Pde6b+ früher und mehr *Grooming*-Verhalten im Vergleich zu blinden C3H/HeH. Dieses deutet auf erhöhte aktive Stressbewältigung hin, da

*Grooming* als Reaktion auf eine neue Umgebung eine adaptive Funktion zum Abbau des Erregungszustandes hat (Spruijt et al. 1992).

Das Verhaltensprofil von sehenden C3H.Pde6b+ mit reduzierten Latenzen bis zum Auftreten bestimmter Verhaltensweisen zeigte, dass intakte Sehfähigkeit einen *früheren* Gebrauch des Verhaltensrepertoires in neuer Umgebung ermöglicht, aber nicht zu erhöhten Aktivitätsniveaus an sich führt. Ob Sehfähigkeit mit erhöhter Aktivität einhergeht oder nicht, ist umstritten. Einerseits gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass sehende Mäuse die selben Aktivitätslevel im Laufrad (Mrosofsky 2003) und gleich hohe Schwimgeschwindigkeiten im *Morris Water Maze Test* aufweisen wie sehende (Voller et al. 2005). Andererseits zeigen sehende Mäuse im Vergleich zu ihren blinden Kontrollen weniger passives Sich-Treiben-Lassen im *Morris Water Maze Tests* (Clapcote et al. 2005).

Ein *früherer* Gebrauch des Verhaltenrepertoires kann als schnellere Anpassung an äußere Gegebenheiten bei sehenden Mäusen im Vergleich zu blinden interpretiert werden. Diese Interpretation wird von der Tatsache unterstützt, dass sehende C3H Mäuse im Vergleich zu blinden kürzer auf dem *Rotating Rod* bleiben (McFadyen et al. 2003) (*Rotating Rod*: Test zum Untersuchen der Motorkoordination und Balance (Dunham and Miya 1957; Crawley 1999b)). Dieses Verhalten kann als aktives Unterbrechen der Testsituation bei sehenden Mäusen interpretiert werden. Allerdings bestätigen die *Rotating Rod* Daten der hier untersuchten C3H.Pde6b+ und C3H/HeH aus dem *Neurological Screen* der GMC nicht die Daten von McFadyen et al.. Im *Neurological Screen* zeigte sich, dass sehende C3H.Pde6b+ *länger* auf dem Rod bleiben als blinde C3H/HeH. Diese Unterschiede wurden jedoch als Sekundäreffekt des niedrigeren Gewichts von C3H.Pde6b+ interpretiert, und nicht als bessere Motorkoordination. Denn leichtere Mäuse erbringen allgemein bessere Leistungen auf dem *RotaRod* als schwerere (Dr. Lore Becker, GMC Presentations C3H sehend, *Neurological Screen*). Somit widersprechen diese Befunde der Arbeit von McFadyen et al. nicht, da in seiner Arbeit Mäuse gleichen Gewichts untersucht worden sind.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Funktion des *Pde6b* Gens unkonditioniertes Verhalten im mHB beeinflusst. Ob dies hauptsächlich auf den Effekten des Gens hinsichtlich der Sehfähigkeit beruht, oder ob die Funktion des Gens in anderen Körperregionen zu dem beobachteten Verhaltensphänotyp beiträgt, bleibt zu klären. Expressionsmuster des *Pde6b* Genes mittels *in-situ* Hybridisierungen wären bei der Beantwortung behilflich. Bis dato

beschränken sich Expressionsanalysen in der Maus allerdings auf die Anwendung von Microarrays und Proteomanalysen, um mit *Pde6b* assoziierte Genexpressionen während des Absterbens der Stäbchen und Zapfen im Auge von Mäusen mit retinaler Degeneration zu erfassen (Cavusoglu et al. 2003; Hackam et al. 2004; Shearstone et al. 2005).

Auf jeden Fall sind aussagekräftige Beurteilungen der Sehfähigkeit sinnvoll für die korrekte Interpretation von Verhaltensphänotypen und sollten daher unabdingbarer Teil jeder Phänotypisierungsstrategie sein.

### 3.2 Teil 2: Einfluss von IVC-Käfighaltung

Der potentielle Einfluss von Haltungsbedingungen auf die Physiologie und das Verhalten von Mäusen ist von steigendem Interesse, insbesondere wenn es das Ziel ist, Unterschiede zwischen Phänotypen auf experimentell induzierte Veränderungen im Mausgenom zurückzuführen – und dieses im großen Maßstab. Zu diesem Zweck wird die umfangreiche Analyse der mutanten Mauslinien voraussichtlich zwischen unterschiedlichen Einrichtungen geteilt werden müssen, was einen Bedarf an Informationen über die Vergleichbarkeit von Phänotypisierungsdaten erfordert.

Es ist bekannt, dass Umweltbedingungen wie auch der genetische Hintergrund Verhaltensphänotypen beeinflussen (Crawley et al. 1997; Wolfer and Lipp 2000). Es war bisher aber nicht bekannt, ob die IVC-Haltung Verhaltensphänotypisierungsergebnisse beeinflussen kann, und wenn, in welchem Ausmaß. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das *unkonditionierte Verhalten im mHB* von in IVC-Käfigen einzelgehaltenen männlichen C3HeB/FeJ und C57BL/6J mit dem von Mäusen in konventionellen Typ II Käfigen gleicher Größe untersucht. Zusätzlich wurden *sensorimotorisches Verhalten* wie auch *kognitive Fähigkeiten* untersucht, um beurteilen zu können, ob ein möglicher Haltungseinfluss im mHB testspezifisch sei.

#### 3.2.1 IVC reduziert Aktivität und verstärkt Angstverhalten einzelgehaltener Männchen

Die IVC-Haltung reduzierte die Lokomotion und die vertikale wie auch horizontale Exploration und verstärkte angstkorreliertes Verhalten in einzelgehaltenen Mäusen beider Stämme. Stammspezifisch reduzierte die IVC-Haltung die Latenz bis zum ersten *Grooming* in

B6J, aber nicht in C3H Mäusen. *Grooming* ist ein Verhalten, das als Reaktion auf Neues/Unbekanntes ausgelöst wird (Dunn et al. 1981) und eine adaptive stresslösende Funktion hat (Spruijt et al. 1992). Daher kann ein früheres Auftreten des *Grooming*-Verhaltens als Indikator für einen geringeren Erregungszustand angesehen werden. Dieser Parameter muss jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Erstens ist gezeigt worden, dass *Grooming*-Verhalten zwischen den Stämmen unterschiedlich ist (Kalueff and Tuohimaa 2005), was in Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen ist. Zweitens wird *Grooming*-Verhalten auch mit Emotionalität in Verbindung gebracht (Hoover-Plow et al. 2001), und ein früheres Auftreten von *Grooming* bei IVC gehaltenen B6J Mäusen ebenfalls als erhöhte Angst angesehen werden kann.

Das zum Klettern auf der Innenseite der Stahlfläche der glatten IVC-Deckel extra angebrachte Gitter („grid“) veränderte den Einfluss der IVC-Käfighaltung auf unconditioniertes Verhalten in einzelgehaltenen C3H Mäusen nicht und modulierte es nur marginal bei B6J Mäusen in den aktivitäts- und angstbezogenen Parametern.

Zusammengenommen zeigte sich erstens, dass die IVC-Käfighaltung eine aktivitätsreduzierende und angststeigernde Wirkung auf einzelgehaltene C3H und B6J Männchen hat. Zweitens, dass das IVC-System die Latenz zum *Grooming* in einzelgehaltenen B6J Männchen reduziert, und drittens, dass das „grid“ nicht ausreicht, um diesen IVC-Haltungseffekten entgegenzuwirken. Letzteres impliziert, dass die Abschwächung der externen Umweltstimuli in IVC-Käfigen – durch ihren soliden Deckel im Vergleich zu konventioneller Haltung – einen stärkeren Einfluss auf unconditioniertes Verhalten hat als die Reduktion der Kletterfläche. Eine Erklärung für die Änderungen der Aktivitätslevel und des Angstverhaltens bei IVC-Käfighaltung ist, dass für Mäuse in IVCs aufgrund der schwächeren Exposition gegenüber externer Umweltstimuli der Wechsel/Übergang in die Testsituation einen gravierenderen Unterschied darstellt als für Mäuse in konventioneller Haltung. Bis dato gibt es keine systematischen Untersuchungen, was den Einfluss akustisch dämpfender/deprivierender Bedingungen auf das Mausverhalten angeht, obwohl Strasser und Dixon (1986) (Strasser and Dixon 1986) gezeigt haben, dass akustische Deprivation bei normal hörender Mäuse aktives Verfolgen im *Resident/Intruder*-Paradigma reduziert.

Unabhängig von den Haltungsbedingungen waren B6J Männchen aktiver als C3H Männchen. Zusätzlich zeigten einzelgehaltene B6J Männchen weniger Angstverhalten als C3H. Das

entspricht früheren Berichten über gezeigtes Verhalten dieser zwei Stämme. Daten aus Angsttests legen nahe, dass B6 Mäuse weniger ängstlich als C3H Mäuse sind (Bouwknicht and Paylor 2002; Ducottet and Belzung 2005). Im Hinblick auf den C3HeB/FeJ Unterstamm der C3H Mäuse ist dies bis jetzt auf Lokomotion und angstkorreliertes Verhalten begrenzt (Tarantino et al. 2000). Da die C3HeB/FeJ Linie stufenweise die Funktion der Retina im Alter von ein bis zwei Monaten verlieren (Chang et al. 2002), also blind werden, mag das ein Grund für die reduzierte Exploration und das erhöhte Angstverhalten im mHB in C3H im Vergleich zu B6J sein.

Im Gegensatz zu C3H sind B6J für ihre spontane lokomotorische Aktivität und hohe *Baseline*-Explorationstendenz als Resonanz auf eine neue, nicht soziale Umgebung bekannt (Crawley and Davis 1982; Nikulina et al. 1991). B6J Mäuse zeigen auch eine hohe emotionale Reaktivität im *Elevated Plus Maze* Test mit einem Vermeidungs-Index der offenen Arme von >90% (Trullas and Skolnick 1993). Dies entspricht dem Niveau des Vermeidens des *Boards*, der offenen Fläche in der Mitte der Testarena der hier vorliegenden Studie. In dieser Arbeit erstreckte sich die auf dem *Board* verbrachte Zeit von 8% (IVC classic) bis 13% (Conventional).

### 3.2.2 IVC erhöht akustischen Schreckreflex einzelgehaltener C3H Männchen

Die IVC-Käfighaltung erhöhte den akustischen Schreckreflexes in einzelgehaltenen C3H Mäusen im Alter von 14 Wochen und reduzierte die Schwelle zum ersten Schreckreflex im Alter von 20 Wochen. Eine Erklärung ist, dass IVC-gehaltene Mäuse sensitiver auf akustische Stimuli reagieren, da sie im Vergleich zu in konventionellen Käfigen gehaltenen Mäusen in einer akustisch dämpfenden/deprivierenden Umgebung aufgezogen wurden und untergebracht waren. Die Erhöhung des akustischen Schreckreflexes in IVC-gehaltenen C3H Mäusen geht wahrscheinlich mit der bereits diskutierten Steigerung des Angstverhaltens im mHB bei IVC-Haltung Hand in Hand. Diese Interpretation stimmt mit Untersuchungen überein, die zeigen, dass eine Korrelation zwischen Angst- und Schreckreflexleveln in Mäusen und Menschen besteht (Shum et al. 2005; Prehn et al. 2006).

Im Gegensatz dazu beeinflusste die IVC-Käfighaltung das sensorimotorische Verhalten von einzelgehaltenen B6J Männchen beider Altersstufen nicht. Dennoch geht der Einfluss von IVC-Käfighaltung bei B6J im Vergleich zu C3H Männchen im Alter von 14 Wochen in die gleiche Richtung (vgl. Abb. 11 a, b), obwohl statistisch nicht signifikant. Letzteres könnte

mehrere Ursachen haben, z.B. sind B6J weniger ängstlich als C3H im mHB gewesen, und B6 Mäuse leiden an einem genetisch bedingten fortschreitenden Hörverlust (Johnson et al. 1997), der im Alter von ungefähr vier Monaten auftritt (Mikaelian 1979; Henry and Chole 1980). Darüber hinaus ist in einer Studie mit Menschen gezeigt worden, dass früh erblindete Individuen besser hören können als normal sehende (Niemeyer and Starlinger 1981), allerdings ist dies bis dato nicht in Mäusen untersucht worden.

Das Diskutierte führte zu der Annahme, dass der angststeigernde Einfluss der IVC-Käfighaltung einen *signifikanten* Anstieg der Amplitude des akustischen Schreckreflexes bei einzelgehaltenen C3H im Vergleich zu B6J Männchen nach sich zieht.

In beiden Stämmen lag die Schreckreflex-Schwelle im Alter von 14 Wochen bei 80 dB. Das Alter reduzierte die Amplitude des Schreckreflexes bei B6J, nicht aber bei C3H Männchen. Dabei war nicht die Schwelle erhöht, sondern die Hörkurve abgeflacht. Aus diesen Daten geht hervor, dass B6J Mäuse aufgrund ihres genetisch bedingten Hörverlustes in Tests, die auf auditorischen Funktionen beruhen, am besten bis zum Alter von 3-4 Monaten oder früher untersucht werden sollten.

### **3.2.3 IVC mit Klettermöglichkeiten fördert Furchtpotentierung einzelgehaltenen B6J Männchen**

Das verwendete FPS Protokoll war unabhängig von den Haltungsbedingungen nicht effizient genug, um konditioniertes Lernverhalten in einzelgehaltenen Männchen vom C3H Stamm zu induzieren, im Gegensatz zu B6J Mäusen. Es ist bekannt, dass Inzuchtstämme sich im Grad des Erlernens konditionierter Furcht in Abhängigkeit von der Anzahl der Konditionierungstrials und der benutzten Schockintensität unterscheiden können (Falls 2002). Bis jetzt wurden kognitive Fähigkeiten dieses speziellen C3H Unterstamms (C3HeB/FeJ) nicht untersucht. Dennoch werden Informationen diesbezüglich benötigt, da dieser Unterstamm im ENU-Mutagenese-Großprojekt als Hintergrundstamm verwendet wird, in welchem einige Verhaltensmutanten gefunden worden sind, die auf die detaillierte Analyse der Funktion ihres zentralen Nervensystems warten (Hrabe de Angelis et al. 2000). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass C3H Männchen die Furchtpotenzierung des akustischen Schreckreflexes schlechter lernten als B6J Männchen.

Bei einzelgehaltenen B6J Männchen war die Potenzierung des Schreckreflexes bei jenen in IVC grid Haltung am deutlichsten und bei jenen in IVC classic Haltung am geringsten



ausgeprägt (vgl. Abb. 10b). Zusätzlich war die Furcht-Potenzierung bei in IVC grid gehaltenen B6J besser als bei konventionell gehaltenen, da letztere nur eine leichte Potenzierung der FPS Performance zeigten. Zusammengenommen deutete dies darauf hin, dass das benutzte FPS-Protokoll für Untersuchungen an in IVC classic einzelgehaltenen B6J Männchen nicht geeignet ist. In diesem Falle sind folglich entweder verbesserte Haltungsbedingungen, z.B. durch den Gebrauch von „grids“, oder ein verbessertes FPS-Protokoll angebracht. Die Forderung nach verbesserten Haltungsbedingungen wird von der Tatsache unterstützt, dass bei Mäusen, die mehr Erlebnisreizen ausgesetzt waren, aufgrund von täglich mehreren Stunden Aufenthalts in einer Umgebung mit zahlreichen Spiel-, Kletter- und Explorationsmöglichkeiten, die stimulusassoziierte Furchtkonditionierung verbessert ist (Rampon et al. 2000). Obwohl das in der GMC verwendete IVC-System eine Messung der Aktivitätsniveaus im Heimkäfig nicht ermöglichte, stehen die hier erhobenen Daten im Einklang mit einer vorhergehenden Studie, die zeigte, dass mehr Bewegung Lernen unterstützt (Vaynman and Gomez-Pinilla 2005). Des Weiteren weisen sie darauf hin, dass Haltung unter akustisch gedämpften Bedingungen hinsichtlich externer Stimuli in Kombination mit Klettermöglichkeiten einen positiven Effekt auf die FPS-Performance bei einzelgehaltenen B6J Männchen hat. Diese Annahme beruhte auf der Tatsache, dass die Furcht-Potenzierung bei B6J Männchen in IVC grid besser war als bei B6J Männchen in konventionellen Käfigen.

### **3.2.4 Vorteile: Testbatterie und Absolutwerte von Verhaltensparametern**

Für die Dateninterpretation sollte in Betracht gezogen werden, dass die Mäuse in der Studie über Effekte der IVC-Käfighaltung auf Verhaltensphänotypisierungsergebnisse wiederholt getestet wurden. Daher ist es wahrscheinlich, dass sich vorherige Erfahrungen auf nachfolgende übertragen haben können („carry over-Effekt“) (McIlwain et al. 2001). Die Verwendung von naiven Mäusen für jeden Test hätte diesen Effekt der Daten ausgeschlossen. Auf der anderen Seite muss für die Phänotypisierung mit hohem Durchsatz – im Hinblick auf Zeit- wie auch Kosteneffizienz – eine Charge Mäuse einer mutanten Linie durch eine Reihe von unterschiedlichen Tests gehen. Um die Tiere so wenig wie möglich zu beeinflussen, ist die Testreihenfolge so konzipiert, dass zuerst die am wenigsten aversiven Tests durchgeführt werden und sich die Testanforderungen diesbezüglich im Laufe der Testbatterie steigern. Zudem bietet eine Testbatterie zwei weitere Vorteile: sie ermöglicht einen Vergleich ein- und desselben Individuums über mehrere Tests hinweg (intra- und interdisziplinär) und reduziert die Anzahl der verwendeten Tiere, was im Hinblick auf den Tierschutz zu begrüßen ist.

Obwohl ein steigendes Interesse an der Frage besteht, ob unterschiedliche Haltungsbedingungen die Variabilität einer Gruppe erhöhen (Tsai et al. 2002; Wolfer et al. 2004), sind die (durchschnittlichen) Absolutwerte der gemessenen Parameter gleichfalls für eine Verhaltensanalyse von mutanten Mauslinien wichtig. Erstens erlaubt die Erfassung von Absolutwerten bei Kontrolltieren die Detektion von Verschiebungen derer *Baselines*. Zweitens ist für die Verhaltensphänotypisierung eine angemessen hohe *Baselineperformance* unabdingbar. Andernfalls wird Phänotypisierung auf der Basis von extremen – minimalen oder maximalen – *Baseline*-Werten die Detektion von Genotyp- oder Behandlungseffekten erschweren. Bezogen auf diese Arbeit folgt daraus, dass Änderungen in Angstparametern diejenigen sind, die auf B6J und C3H Hintergrund am schwierigsten zu identifizieren sind, wenn die Mäuse einzeln in IVCs gehalten werden. Das basiert auf der Tatsache, dass Angstparameter niedrige Durchschnittswerte aufwiesen, wenn Mäuse beider Stämme in IVCs gehalten wurden, dies gilt besonders bei C3H Mäusen. Obwohl die IVC-Haltung auch die Lokomotion reduzierte, wären die noch vorhandenen lokomotorischen Aktivitäten hoch genug, um Ausschläge in beide Richtungen feststellen zu können.

### **3.2.5 IVC erschwert Detektion anxiogener Effekte bei einzelgehaltenen Männchen**

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die IVC-Käfighaltung im mHB erhobene Verhaltensdaten beeinflussen kann und ferner die Effekte der IVC-Käfighaltung nicht auf unkonditioniertes Verhalten begrenzt sind. Die Haltung von männlichen Mäusen in IVCs wie sie in der GMC verwendet werden, macht im mHB die Detektion von angststeigernden genetischen Effekten unmöglich auf C3H Hintergrund und erschwert sie auf B6J Hintergrund. Der Gebrauch von zusätzlichen “grids” in diesen IVCs wirkte diesen Effekten in C3H Mäusen nicht entgegen und verbesserte sie kaum bei B6J Mäusen. Das legt nahe, dass die Klettermöglichkeiten, wie sie hier in den IVCs angeboten wurden, einfach zu wenig sind, um die Wirkung von IVC-Haltung auf unkonditioniertes Verhalten zu beeinflussen. Es wird geschlossen, dass der IVC-Haltungseffekt hauptsächlich auf der akustisch dämpfenden/deprivierenden Eigenschaft gegenüber externen Stimuli beruht. Allerdings zeigte sich für das Testen von konditionierter Furcht im FPS-Paradigma, dass IVC grid Haltung sich gegenüber konventioneller Haltung als besser erwies. Das deutet darauf hin, dass die IVC-Käfighaltung in Kombination mit zusätzlichen Klettermöglichkeiten einen Vorteil für FPS-Lernen bietet. Es ist unklar, ob dieser Effekt sich auch auf kognitive Funktionen erstreckt, die auf anderen sensorischen Modalitäten beruhen. Der Befund, dass eine Änderung

der IVC-Käfigstruktur Auswirkungen auf das Verhalten von Mäusen hat, bekräftigt kürzlich erzielte Forschungsergebnisse. Diese zeigen, dass unterschiedliches Zubehör in IVC-Käfigen (Kartonrolle oder Maushaus) Verhaltensparameter von Mäusen ungleich beeinflussen kann (Tucci et al. 2006).

Im Folgenden wird erläutert, inwiefern diese Ergebnisse auch für gruppengehaltene und weibliche Mäuse gelten.

### **3.2.6 Anders als B6J Männchen: IVC reduziert Angstverhalten bei B6J Weibchen**

Bei gruppengehaltenen C3H und B6J beider Geschlechter reduzierte die IVC-Käfighaltung die Lokomotion nur im B6J Stamm und beeinflusste nur bei ihnen Angstverhalten, wie auch horizontale Exploration signifikant. Interessanterweise war die Wirkung der IVC-Käfighaltung auf das Angstverhalten, sowie auf die horizontale Exploration auf dem *Board* geschlechtsabhängig: IVC-gruppengehaltene B6J Männchen zeigten *tendenziell* erhöhtes Angstverhalten und weniger horizontale Exploration. Bei B6J Weibchen war dieser IVC-Haltungseffekt im Vergleich zu konventionell gehaltenen genau entgegengesetzt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die IVC-Käfighaltung sich positiv auf das Angstverhalten bei gruppengehaltenen B6J Weibchen auswirkt. Eine ähnliche Studie, in welcher durch die Benutzung eines durchsichtigen Plastikdeckels eine Einschränkung der Klettermöglichkeiten sowie eine akustische Dämpfung, wie bei den hier benutzten IVC classics gegeben war, zeigte ebenfalls einen geschlechtsabhängigen Effekt der Haltungsbedingungen auf Angstverhalten bei B6J Mäusen (Pietropaolo et al. 2007). Allerdings zeigen B6J Weibchen jener Studie erhöhtes Angstverhalten. Damit sind in beiden Konzepten die Klettermöglichkeiten und die akustischen Eigenschaften in den Haltungskäfigen nicht die einzigen Faktoren, die das Angstverhalten von B6J Weibchen beeinflussen, sondern vielmehr das *gesamte* Haltungs- und Testungskonzept. Denn Pietropaolo et. al. benutzten fast doppelt so große Käfige und hatten mit 6-7 Tieren pro Käfig eine größere soziale Gruppe als in dieser Arbeit. Ferner wurden die Tiere während der Dunkelphase getestet, waren jünger und der verwendete Angsttest war das *Elevated Plus Maze*.

Die IVC-Haltung verstärkte in Männchen beider Stämme das *Grooming*-Verhalten, wobei C3H Männchen mehr *Grooming* als B6J zeigten. Das *Grooming*-Verhalten von IVC-gehaltenen Weibchen war gleich den in konventioneller Haltung. Untersuchungen über das *Grooming*-Verhalten als Reaktion auf Neues vom C3H Stamm im Vergleich zu anderen

Stämmen sind bisher nicht beschrieben. Dagegen ist bekannt, dass B6J Männchen als Reaktion auf neue Umwelt mehr *Grooming*-Verhalten im Vergleich zum 129 Stamm zeigen (Rodgers et al. 2002; Kalueff and Tuohimaa 2004).

Bemerkenswerterweise wurden die soziale Affinität, wie auch die vertikaler Aktivität bei gruppengehaltenen C3H und B6J Mäusen nicht von den Haltungsbedingungen beeinflusst. Somit sind beide Verhaltensdimensionen als relativ robust gegenüber Haltungseffekten anzusehen. Dies gilt zumindest bei gruppengehaltenen Mäusen dieser Stämme und für deren Verhalten im mHB. Eine robuste soziale Affinität hinsichtlich der Haltungseffekte zeigen auch zwei Studien über die soziale Affinität von C57BL/6J und BALB/cJ Mäusen. Unabhängig von Unterschieden in Haltungs/Labor- und Testbedingungen kommen beide zu dem Ergebnis, dass C57BL/6J eine höhere soziale Affinität haben als BALB/cJ (Brodkin et al. 2004; Sankoorikal et al. 2006). Um die Hypothese bestätigen zu können, wären zusätzliche soziale Tests unter unterschiedlichen Haltungs- und Testbedingungen in einer einzigen Studie nötig. Bisher ist das Sozialverhalten von Inzuchtstämmen im Verhältnis zu Studien über z.B. deren Angstverhalten oder Lokomotion insgesamt relativ wenig untersucht worden.

Gruppengehaltene C3H Mäuse zeigten im Vergleich zu B6J weniger lokomotorische Aktivität. Die vertikale Aktivität war bei gruppengehaltenen C3H ausgeprägter als bei B6J. Damit war die Stammreihenfolge der vertikalen Aktivität bei gruppengehaltenen Mäusen bzw. genauer bei Männchen genau entgegengesetzt der Stammreihenfolge bei einzelgehaltenen Männchen (s. 2.2.1). Die Stammreihenfolge in der *Rearing*-Aktivität hängt somit von der Haltung und laut Literatur auch von der Testkonzeption ab. So ist die *Rearing*-Aktivität bei C3H im Y-Maze höher (Logue et al. 1997) und im OF niedriger als bei B6J (Moy et al. 2007). Jenes verdeutlicht zusätzlich, dass Testergebnisse nicht unabhängig von ihrer allgemeinen Konzeption sind.

C3H zeigten eine höhere soziale Affinität während des Testens als B6J Mäuse. Bekannt ist, dass beide Stämme zu den Stämmen gehören, die im Vergleich zu anderen einen Gesellschaftstrieb zeigen (Moy et al. 2007), wobei diese Studie sich auf Männchen beschränkt. Für B6J Mäuse bestätigen weitere Studien diesen Sachverhalt (Nadler et al. 2004) und erweitern ihn auch auf B6J Weibchen (Brodkin et al. 2004; Sankoorikal et al. 2006). Allerdings beziehen sich diese Aussagen auf den Gesellschaftstrieb gegenüber *unbekannten* Artgenossen. Präsentiert man beiden Stämmen einen bekannten und einen neuen Artgenossen gleichzeitig, so präferieren C3H den schon bekannte und B6J den neuen (Moy et al. 2007).

Die höhere soziale Affinität der C3H zu bekannten Käfiggenossen im Vergleich zur niedrigeren bei B6J im mHB entspricht dem Befund von Moy et al. Dies mag mit der Blindheit des C3H Stammes zusammenhängen (vgl. 2.1.3).

Geringere Angstverhalten und erhöhte Explorationsaktivität bei C3H Männchen im Vergleich zu C3H Weibchen bestätigen die Befunde der vorherigen Untersuchungen im OF und mHB (ohne *Board*), bei denen C3H Männchen als weniger ängstlicher waren als Weibchen (vgl. 2.1.1 und 2.1.2). Zusammen legten die Daten nahe, dass innerhalb dieses Verhaltensmoduls C3H Weibchen generell ängstlicher reagieren als C3H Männchen.

Bei B6J war das Verhältnis von Männchen und Weibchen hinsichtlich des Angstlevels abhängig von den Haltungsbedingungen (Conventional: Weibchen ängstlicher; IVC: Männchen ängstlicher). Dies zeigte in Kombination mit den OF/mHB Ergebnissen der B6J, die Unterschiede im Geschlechterverhältnis je nach Test lieferten, dass sich eine Interpretation von Verhaltensergebnissen ohne detaillierte Hintergrundinformationen verbietet. Insgesamt legte die Datenlage nahe, dass B6J sensitiver auf Umwelteinflüsse reagieren als C3H.

Zusammenfassend zeigte sich, dass bei gruppengehaltenen C3H und B6J IVC-Haltungseffekte auf unkonditioniertes Verhalten im mHB abhängig vom Stamm und Geschlecht sind. Damit sind Einflüsse der IVC-Käfighaltung nicht zu verallgemeinern. Es wurde deutlich, dass je mehr Faktoren in die Analyse miteinbezogen werden (Faktoren wie Haltungsbedingungen, Stamm und Geschlecht), desto komplexer sind die gewonnenen Erkenntnisse.

### **3.2.7 Gruppenhaltung – Kompensiert IVC-Effekte bei C3H Männchen**

Im Vergleich zur Einzelhaltung zeigte sich, dass Gruppenhaltung bei C3H Männchen fast alle IVC-Haltungseffekte kompensiert, da hier weder die lokomotorische noch die vertikale Aktivität reduziert waren, noch verstärktes Angstverhalten detektiert wurde.

Bei B6J Männchen reicht Gruppenhaltung nicht aus, um die (meisten) IVC-Haltungseffekte auf unkonditioniertes Verhalten im mHB zu kompensieren. So reduzierte bei B6J Männchen die IVC-Käfighaltung die Lokomotion, verstärkte angstkorreliertes Verhalten und erhöhte *Grooming*-Verhalten unabhängig davon, ob Einzel- oder Gruppenhaltung vorlag.

Inwiefern die gefundenen IVC-Haltungseffekte auf verschiedene IVC-Systeme zutreffen, bleibt zu klären, da diese sich voneinander in Käfiggröße, Aufbau und Funktionalität unterscheiden und somit die Art des IVC-Systems sich ebenfalls unterschiedlich auf das Verhalten auswirken könnte.

### **3.3 Teil 3: Nützlichkeit des mHB im Verhaltensprimärscreen der German Mouse Clinic**

Das mHB wird in der GMC seit 2003 als Verhaltensprimärscreen verwendet. Mit diesem Test wird alle zwei Wochen eine neue mutante Mauslinie auf einen potentiellen Verhaltensphänotyp analysiert. Neben dem Vergleich des mHBs mit dem *Open Field* und der Untersuchung der Effekte der GMC-spezifischen IVC-Käfighaltung auf unkonditioniertes Verhalten im mHB, stellte die Reproduktion schon bekannter Phänotypen einen weiteren Schritt dar, das mHB zu evaluieren.

Es sollte geklärt werden, ob das mHB sensitiv genug ist, bekannte Verhaltensphänotypen ebenfalls zu detektieren. Untersucht wurden hierzu der Inzuchtstamm PWD/Ph und die mutante Mauslinie CRHR1 ko. Dabei sind PWD/Ph Männchen als explorativer im Vergleich zu C57BL/6J (Fernandes et al. 2004) und CRHR1 ko Mäuse als lokomotorisch aktiver mit erniedrigtem angstkorrelierten Verhalten im Vergleich zu den Kontrollen (Timpl et al. 1998) beschrieben worden.

Darüber hinaus wurden die bis dato 62 untersuchten Linien im mHB statistisch hinsichtlich der quantitativen und qualitativen Informationen, die sich aus dem Test ergeben, zusammengefasst. Exemplarisch wurden anschließend an der mutanten Linie W04406 (Neurochondrin), bei welcher mutante Weibchen in der Primärphänotypisierung Veränderungen in den Angst- und Sozialparametern zeigten, über den Primärscreen auch die Folgeuntersuchungen detailliert dargestellt.

## Analyse bereits bekannter Verhaltensphänotypen

### 3.3.1 PWD/Ph-Verhaltensphänotyp auf Weibchen und Sozialverhalten ausgedehnt

Die mHB-Analyse ergab einen deutlichen Unterschied der Lokomotion und des Explorationsverhalten von PWD/Ph Mäusen im Vergleich zum B6J Stamm: PWD Mäuse beider Geschlechter zeigten erniedrigte Lokomotion und erniedrigte vertikale Exploration. Die Reduktion der vertikalen Exploration weist nicht notwendiger Weise auf veränderte Balance und Koordination in PWD Mäusen hin. Erstens machten sie zwar weniger *Rearings*, zeigten dieses Verhalten aber *früher* als B6J Mäuse. Zweitens bewegten sich PWD Mäuse schneller, was Motordefizite ebenfalls ausschließt. Dieses Muster deutet auf einen Stammunterschied im Explorationsverhalten hin bei Abwesenheit spezifischer motorischer Unterschiede hin.

Die im mHB reduzierte Lokomotion der PWD Mäuse widerspricht nicht notwendigerweise den Befunden von Fernandes und Mitarbeitern (Fernandes et al. 2004), die für Männchen beider Stämme gleiche lokomotorische Aktivitäten im *Open Field* Test berichten (Weibchen sind in der Originalarbeit nicht untersucht worden). Der Unterschied zwischen beiden Arbeiten ist auf Unterschiede der Haltungsbedingungen und Testkonzepte zurückzuführen. Im Gegensatz zu Fernandes und Mitarbeitern wurden Mäuse der vorliegenden Arbeit in *Gruppen* gehalten (in Individually Ventilated Cages), wurden vor dem eigentlichen Test *nicht* an die Testarena gewöhnt (keine Habituationsphase) und wurden im Vergleich zu grellen (600 Lux) in *moderaten* Lichtverhältnissen (120 Lux) getestet. Es ist bekannt, dass Haltungsbedingungen, Habituation an die Testarena und auch Lichtintensitäten einen Einfluss auf Verhalten haben (Crabbe et al. 1999; Bolivar et al. 2000; Fentrop N 2000). Fernandes und Mitarbeiter haben *habituerte* Lokomotion gemessen, die frei von der stressauslösenden Wirkung einer unbekanntenen Umgebung sein sollte. Im mHB wurden die Mäuse nur an das Gruppenkompartiment, nicht aber an die Testarena habituiert, um explizit eine *Reaktion auf Unbekanntes* hervorzurufen, da diese eine Antwort auf Stress und *Coping* (Bewältigungsstrategie) reflektiert. Zudem sind Mäuse im mHB aktiver als im OF (vgl. 2.1.1), so dass das mHB sensitiver in Bezug auf die Detektion von Verhaltensunterschieden zwischen dem PWD/Ph und dem B6J Stamm sein könnte als das OF.

Die niedrigere Lokomotion in PWD Mäusen wurde ebenfalls vom Neurologischen Screen berichtet (Dr. Lore Becker, GMC Presentations PWD/Ph, *Neurological Screen*) und als Konsequenz der *jump escapes* (vertikales Sprungverhalten) diskutiert, die bei PWD, nicht aber beim B6J Stamm auftraten. Da die Testarena des mHBs wesentlich größer und die Testdauer im mHB länger ist als das im Neurologischen Screen verwendete Protokoll, wird die Reduktion der Lokomotion im mHB bei PWD Mäusen nicht als Folge von *jump escapes* per se bewertet. Diese Annahme wird von der Tatsache unterstützt, dass keine Unterschiede in der Lokomotion gefunden worden sind, obwohl PWD Männchen im Vergleich zu B6J Männchen im OF *jump escapes* machen (Fernandes et al. 2004).

Ferner zeigten PWD Mäuse im Vergleich zu B6J weniger Angstverhalten, sowie erhöhtes *Grooming*-Verhalten während der Testsituation. Letzteres deutet auf eine aktivere Stressbewältigung hin, wenn man *Grooming*-Verhalten als Reaktion auf Unbekanntes eine adaptive Beruhigungsfunktion zuspricht (Spruijt et al. 1992). Welcher Stamm gestresster war, kann daraus nicht geschlossen werden. Dass das *Grooming* hier die emotionale Komponente erhöhter Ängstlichkeit widerspiegelt (Hoover-Plow et al. 2001), ist unwahrscheinlich, da PWD Mäuse ja erniedrigtes Angstverhalten zeigten. In Summe entsprechen diese Befunde früheren, die zeigen, dass PWD Männchen weniger ängstlich als B6J Männchen sind (weniger *neophob* - bei Fernandes et al. hinsichtlich der Exploration des OF-Zentrums mit unbekanntem Objekt) und mehr *Grooming*-Aktivität zeigen (Fernandes et al. 2004). Sie erstrecken sich zudem auch auf PWD Weibchen.

Des Weiteren bestätigte die mHB-Analyse erhöhte Exploration unbekannter Objekte bei PWD Männchen im Vergleich zu B6J Männchen (Fernandes et al. 2004) und dehnt diese zusätzlich auch auf PWD Weibchen aus. Denn PWD Mäuse waren im mHB mehr an den Objekten interessiert als B6J Mäuse. Als Folge der erhöhten Explorationsdauer an beiden Objekten wurde die Objekterkennungsaufgabe von PWD Mäusen besser ausgeführt, dennoch blieb dieser Unterschied nicht signifikant.

Die zusätzlich geringere sozialen Affinität bei PWD Mäusen könnte eine Folge reduzierter Lokomotion im mHB sein oder eine tatsächlich geringere soziale Affinität widerspiegeln. Um dieses zu unterscheiden, müsste das Sozialverhalten des PWD Stamms in spezifischeren Tests im Detail untersucht werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Befunde im mHB mit denen von Fernandes und Mitarbeitern übereinstimmen. Obwohl die mHB-Analyse einen Stammunterschied in der



Vorwärtslokomotion mit weniger aktiven PWD Mäusen im Vergleich zu B6J Mäusen ergab, spiegelt dieses eher einen Unterschied im Explorationsverhalten als einen Unterschied im Lokomotionsniveaus an sich wider. Die mHB-Analyse bestätigte, dass PWD Mäuse im Vergleich zu B6J Mäusen weniger ängstlich sind, ein aktiveres *Grooming*-Verhalten haben und sich mehr für unbekannte Objekte interessieren. Ferner wurden alle Ergebnisse auf PWD Mäuse beider Geschlechter ausgeweitet und deuten reduzierte soziale Affinität bei PWD Mäusen an.

Der PWD Stamm ist hinsichtlich der Analyse des emotionalen Verhaltens ein höchst interessanter Stamm, da er sich weniger ängstlich und explorativer verhält als der B6J Stamm, obwohl der C57BL/6J Stamm bereits als wenig ängstlich (Bouwknicht and Paylor 2002) mit einer hohen Explorationstendenz im Vergleich zu anderen Stämmen (Crawley and Davis 1982) beschrieben wird. Folglich sollten PWD Mäuse ein höheres Grundniveau (höhere Performance, *Baselines*) in den verschiedenen Angst- und Gedächtnistests haben. Allerdings muss man auch in Kauf nehmen, dass die *jump escapes* der PWD Mäuse deren Handhabung und Testung erschweren.

### 3.3.2 CRHR1 ko-Verhaltensphänotyp auf erhöhtes Explorationsniveau erweitert

Die Verhaltensanalyse der CRHR1 ko Mauslinie in der *Light Dark Box* zeigte, dass CRHR1 ko Mäuse beider Geschlechter bei gleicher Lokomotion wie die Kontrollen reduziertes Angstverhalten zeigten. Sie betraten das helle Kompartiment früher, verbrachten dort mehr Zeit und zeigten prozentual mehr Eintritte ins helle Kompartiment.

Somit bestätigen die Daten hier eine bei CRHR1 ko Mäusen erhöhte Exploration des hellen Kompartiments der *Light Dark Box*, jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie bisher veröffentlicht (Timpl et al. 1998), da einige Effekte nur Tendenzen darstellten. Die Unterschiede im Ausmaß sind nicht überraschend aufgrund der unterschiedlichen Haltungsbedingungen und Handhabung der Tiere, die Tierphysiologie und Verhalten beeinflussen (Crabbe et al. 1999; Wahlsten 2001; Champy et al. 2004).

Der CRHR1 ko Phänotyp aus den *Light Dark Box* Analysen wurde nachfolgend ebenfalls im modified Hole Board detektiert.

CRHR1 Mutanten beider Geschlechter zeigten im Vergleich zu den Kontrollen im mHB erhöhte Lokomotion, was der von Timpl et al. (Timpl et al. 1998) beobachteten erhöhten Lokomotion in neuer Umgebung (OF-Untersuchungen) bei CRHR1 ko Mäusen entspricht. Die Veränderungen des Angstverhaltens bei CRHR1 ko Mäusen waren im Vergleich zu Beobachtungen von Timpl und Mitarbeitern allerdings weniger ausgeprägt, da das Angstverhalten von CRHR1 Mutanten im mHB Test nur *tendenziell* reduziert war. Zwar zeigten CRHR1 ko Mäuse erhöhte Aktivität in Richtung des aversiven Bereichs der Arena, jedoch unterschied sich die im aversiven Bereich verbrachte Zeit, als ausdrücklichste Messgröße für Angstverhalten, nicht von den Kontrollen. Zusätzlich war die Exploration auf dem *Board* in CRHR1 ko Mäusen, sowohl die vertikale als auch die horizontale, erhöht. Des Weiteren zeigten CRHR1 Mutanten beider Geschlechter in der mHB-Testsituation öfters *Grooming*-Verhalten, was bei Weibchen deutlicher ausgeprägt war als bei Männchen, da die Weibchen auch eine verlängerte *Grooming*-Dauer aufwiesen. Alles zusammen deutete auf eine aktivere Bewältigungsstrategie in mutanten Weibchen hin, wenn man davon ausgeht, dass das *Grooming*-Verhalten als Reaktion auf Neues zur Abregung dient (Spruijt et al. 1992).

Die Explorationsaktivität in der *Box* war, parallel zu der des *Boards*, bei CRHR1 Mutanten ebenfalls erhöht, wie aus häufigeren *Rearings* hervorging. Mutante Männchen explorierten zudem die Objekte häufiger. Aber ein Effekt der Mutation auf die Gedächtnisleistung im Objekterkennungstest innerhalb des mHBs war nicht ersichtlich, da die Objektindizes von CRHR1 ko Männchen denen von Kontrollmännchen entsprachen.

Die hier erhobenen Daten legen nahe, dass CRHR1 Mutanten mit erhöhtem Explorationsverhalten auf eine neue Umgebung reagieren. Dieses geht mit der Ansicht konform, dass diese Mutanten reduziertes Angstverhalten aufweisen.

Zusammenfassend bestätigte diese Analyse reduziertes Angstverhalten bei CRHR1 ko Mäusen in der *Light Dark Box* und im mHB, wobei nicht im gleichen Ausmaß wie in der Publikation beschrieben. Die Unterschiede in den Absolutwerten könnten eine Folge der unterschiedlichen Prozedere sein (z.B. Vorbehandlung, Haltung, Transfer). Die erhöhte lokomotorische Aktivität der CRHR1 Mutanten im OF (Timpl et al. 1998) war im mHB reproduzierbar, und zwar für beide Geschlechter, wobei aus den veröffentlichten Daten nicht hervorgeht, ob auch dort beide Geschlechter auf Verhalten analysiert worden sind. Darüber

hinaus konnte die mHB-Analyse die Befunde um erhöhte Exploration und erhöhtes *Grooming*-Verhalten in Mutanten beider Geschlechter erweitern.

### **3.3.3 mHB sensitiv für die Detektion von Verhaltensphänotypen**

Wie an den Beispielen des Inzuchtstammes PWD/Ph und der mutanten Mauslinie CRHR1 ko gezeigt, besitzt das mHB im Verhaltensmodul die Sensitivität, bereits publizierte/bekannte Verhaltensphänotypen detektieren zu können. Zudem zeigte sich bei Mäusen beider Beispiele, dass mit Hilfe des mHBs die Verhaltensprofile auf zusätzliche Verhaltensdimensionen ausgedehnt werden können. Letzteres verdeutlicht den Vorteil des mHB Tests gegenüber anderen Tests: Die Erfassung mehrerer Verhaltensdimensionen in nur einem kurzen Test. Grundsätzliche Unterschiede der Absolutwerte und damit möglicherweise der Signifikanzniveaus zwischen den Originalarbeiten an PWD/Ph bzw. CRHR1 ko Mäusen und der hier vorliegenden Arbeit ließen sich aufgrund unterschiedlicher Laborbedingungen und Vorgeschichte der Mäuse nicht vermeiden. Das wurde besonders bei der Analyse der CRHR1 ko Mauslinie deutlich. Nichtsdestotrotz ergeben sich die gleichen Aussagen. Betrachtet man das Verhaltensprofil der CRHR1 ko Mauslinie im mHB - ohne den Vergleich zur schon bekannten Arbeit von Timpl et al. zu ziehen - so wäre allein aufgrund dieser mHB-„Primär“-Analyse diese Mauslinie als für Sekundärtests interessant einzustufen und würde in spezifischeren Angsttests detaillierter phänotypisiert werden.

Insgesamt kann geschlossen werden, dass das mHB einen effizienten Test für die *primäre* Evaluierung eines Verhaltensphänotyps darstellt.

Die Ergebnisse der Phänotypenreproduktion der beschriebenen Mauslinien PWD/Ph und CRHR1 ko reihen sich in die Auswertung aller bis dato analysierten 62 Mauslinien ein. Denn die anderen vier Linien mit bekanntem Phänotyp wurden ebenfalls alle im mHB bestätigt. Dieses unterstützt zusätzlich die bereits diskutierte Sensitivität des Tests innerhalb des eigenen Labors.

### **3.3.4 mHB liefert bedarfsgerechte Spannweite zur Phänotypendetektion im Primärscreen**

Quantitativ diente das mHB bis zum Auswertungszeitpunkt hinsichtlich mutanter Linien mit 63% hauptsächlich zur Untersuchung von Linien aus Gen-gesteuerten Ansätzen der knockout

(40%) und Gene-Trap-Technologie (23%). Auf den Phänotyp-gesteuerten Ansatz mit Mäusen aus dem ENU-Screen entfielen 22% der Untersuchungen, der Rest waren andere Mutationstechniken.

Dieses Verteilungsmuster der Prozentsätze der Mutationstechniken entsprach dem der Linien, denen kein Verhaltensphänotyp im mHB zugeordnet wurde. Damit zeigte sich, dass das mHB Phänotypen unabhängig von der Mutagenese-prozedur detektiert. Dass ENU-Mutanten im Pool der Linien, denen kein Verhaltensphänotyp im mHB zugeordnet wurde, mit 6% im geringeren Maße vorkommen als mit 22% im Pool der gesamten mutanten Linien, lag an der Art des Versuchsansatzes. Der ENU-Screen ist ein Phänotyp-gesteuerter Ansatz, d.h. systemimmanent sollten die aus dem ENU-Screen ausgewählten und zur Analyse in die GMC geschickten Mutanten im Vergleich zu Mutanten aus Gen-gesteuerten Ansätzen mit deutlich höherem Anteil phänotypische Auffälligkeiten zeigen.

Insgesamt wurden mehr als dreiviertel (77%) der Mauslinien mit Veränderungen der mHB-Parameter einem Phänotyp zugeordnet, 13% davon entfielen auf schon bekannte Phänotypen. Anders gesehen bedeutete dies, dass in ca. einem Viertel der Mauslinien kein Phänotyp im mHB detektiert wurde. In Verbindung mit der erfolgreichen Reproduktion schon bekannter Verhaltensphänotypen auch im mHB zeigte dies, dass das mHB sensitiv genug ist, um relevante Verhaltensphänotypen zu detektieren, aber nicht übersensitiv, um in jeder Mauslinie eine Wirkung der Mutation auf Verhalten zu implizieren.

Diese Analyse zeigte ferner, dass es berechtigt und notwendig ist, Phänotypisierungen in Männchen und Weibchen durchzuführen, zumindest hinsichtlich der Verhaltensphänotypisierung. Denn nahezu die Hälfte der im mHB gefundenen Primärphänotypen war geschlechtsabhängig. Dabei hätten 30% der Phänotypen nicht detektiert werden können, wenn nur Männchen analysiert worden wären.

In qualitativer Hinsicht wurden mit dem mHB zur Hälfte (51%) hauptsächlich Primärphänotypen detektiert, die Veränderungen in der vorwärtsgerichteten Lokomotion (22%) und im Aktivitätsniveau (29%) zeigten. Dieses entspricht der Tatsache, dass Verhalten letztendlich auf Bewegung basiert. Sekundäre Tests für interessante Linien müssen dann dem Grund für veränderte Lokomotion sowie Aktivität auf den Grund gehen. Dabei ist zu erwarten, dass andere Verhaltensdimensionen wie z.B. Angstverhalten zu diesen Veränderungen beigetragen haben könnten. In dieser Kategorie befanden sich aber auch die

Linien, deren mHB-Verhaltensphänotyp als sekundär anzusehen ist, also eine Konsequenz anderer Phänotypen darstellt, wie z.B. geringere Muskelbildung.

Die andere Hälfte der Primärphänotypen entfiel auf Veränderungen in der Exploration (horizontale und vertikale) (19%) und im Sozialverhalten (13%), sowie mit restlichen 17% auf ganz spezifische Befunde in der vertikalen Exploration, im Angst- und *Grooming*-Verhalten und in der Objektexploration. Damit zeigte sich, dass mit dem mHB schon im Primärscreen sehr spezifische Änderungen im Verhalten der Mauslinien aufgezeigt werden können. Hier ließe sich die Weiteranalyse der Primärphänotypen konkreter gestalten als bei den Kategorien der Lokomotion und der Aktivitätslevel.

Schlussendlich zeigte sich auch in der qualitativen Auswertung der Phänotypenanalyse die Wichtigkeit, beide Geschlechter zu untersuchen. Denn geschlechtsabhängige Phänotypen fanden sich in den häufig vorkommenden Phänotypenklassen Vorwärtslokomotion, Aktivitätsniveau und Sozialverhalten im Verhältnis 1:1. Das gleiche Muster findet sich ebenfalls in den seltener vorkommenden Phänotypenklassen. Letzteres muss allerdings aufgrund des geringeren Prozentsatzes der Linien pro Phänotypenklasse als Anhaltspunkt gewertet werden.

Insgesamt wurden 63% der im mHB detektierten Phänotypen als reine Verhaltensphänotypen klassifiziert, und die entsprechenden Mauslinien somit als für weiterführende, sekundäre verhaltensbiologische Untersuchungen prädestiniert angesehen.

Insgesamt zeigte der statistische Überblick der im mHB analysierten Linien und gefundenen bzw. bestätigten (Primär)phänotypen, dass das mHB im eigenen Labor eine bedarfsgerechte Spannweite und Sensitivität zur Phänotypendetektion besitzt und somit erwiesenermaßen einen leistungsstarken und effizienten Primärscreen im GMC-Workflow darstellt.

### **Vom Primär- zum Sekundär-/Tertiärscreen: Verhaltensanalyse der Gene-Trap Mauslinie W04406 (Neurochondrin)**

#### **3.3.5 W04406 (Neurochondrin) Linie: Erfolgreiche Reproduktion der Primärphänotypisierung**

Das erhöhte angstkorrelierte Verhalten und die erhöhte soziale Affinität bei gruppengehaltenen *Ncdn* ko Weibchen aus der mHB-Primärphänotypisierung wurden im

Rahmen dieser Arbeit reproduziert. Bemerkenswerterweise fand sich in Ncdn ko Männchen ein ähnliches Muster, bei allerdings nur marginalen Änderungen im Angstverhalten, da nur die maximal verbrachte Zeit auf dem *Board* erniedrigt war.

### **3.3.6 Sozialverhalten mutanter Ncdn Weibchen im mHB verändert sekundär Angstparameter**

Die zusätzlichen mHB Untersuchungen legten nahe, dass die Angstparameter in Ncdn ko Weibchen als Folge des erhöhten Sozialkontakts beeinflusst wurden. Somit sind sie als sekundäre Verhaltensänderungen anzusehen und nicht als potentieller Angstphänotyp im mHB. Denn ohne sozialen Kontakt während des Testens zeigten unabhängig voneinander weder gruppen-, noch einzelgehaltene Ncdn Mutanten beider Geschlechter Änderungen in den Angstparameter.

Insgesamt nahm bei allen drei mHB-Testkonzepten das Phänotypenmuster der Ncdn Mutanten beider Geschlechter aus der Gruppen-Haltung/Einzel-Testung eine Mittelstellung zwischen den beiden anderen Konzepten ein. Wie bei der Einzel-Haltung/Einzel-Testung zeigten sich hier keine Änderungen in den Angstparametern „Eintritte und durchschnittliche Zeit auf dem *Board*“. Aber wie bei der Gruppen-Haltung/Gruppentestung war hier die „maximale Zeit auf dem *Board*“ im Vergleich zu den Kontrollen reduziert, allerdings nur *tendenziell*. Dies bekräftigt die Abhängigkeit der Angstparameter von der sozialen Komponente, wobei dieser Effekt an sich nur bei ko Weibchen deutlich hervortrat.

### **3.3.7 Angstphänotyp in Ncdn Mutanten nicht detektierbar**

Die Schlussfolgerung, dass Änderungen der Angstparameter im mHB bei Ncdn ko Weibchen als sekundär einzustufen sind, bestätigten zudem die Ergebnisse spezifischerer Angsttests. So zeigten Ncdn ko Mäuse in der *Elevated Plus Maze* sowie in der *Light Dark Box* bei gleicher Lokomotion wie die Kontrollen keine Veränderungen in den Angstparametern. Dass diese Beobachtungen zudem unabhängig voneinander bei Ncdn Mäusen in unterschiedlichen Haltungsbedingungen gemacht wurden, legte nahe, dass ein potentieller Angstphänotyp nicht detektierbar war.

Allerdings waren die lokomotionskorrelierten Angstparameter im hellen Kompartiment der *Light Dark Box* bei Mutanten Ncdn verändert. Gruppengehaltene Ncdn ko Weibchen machten prozentual weniger Eintritte ins helle Kompartiment, betraten es aber *früher* als die Kontrollen. Einzelgehaltene Ncdn ko Mäuse beider Geschlechter betraten das helle

Kompartiment so oft wie die Kontrollen, aber *später*. Zusammen mit der Tatsache, dass in beiden Untersuchungen die Explorationsdauer des hellen Kompartiments gleich den Kontrollen war, sind die Änderungen der lokomotionskorrelierten Angstparameter als abhängig von der sozialen Struktur im Heimkäfig der Ncdn Mäuse einzustufen.

Aus den Ergebnissen der mHB, EPM und LD Untersuchungen wird geschlossen, dass unter den gegebenen Bedingungen in der Gene-Tap Mauslinie W04406 (Neurochondrin) keine funktionelle Auswirkung der Mutation auf Angstverhalten nachgewiesen werden konnte.

### **3.3.8 Aktive soziale Interaktion: Ncdn ko Weibchen verhalten sich wie Männchen**

Da Ncdn ko Weibchen (und Männchen) im mHB erhöhte soziale Affinität zeigten, wurden sie konsequenter Weise im *Social Interaction* Test auf ihre Präferenz, soziale Interaktionen mit neuen Artgenossen zu initiieren, untersucht. Im Vergleich zu Kontrollen wurde jedoch keine erhöhte soziale Interaktion bei Ncdn Mutanten beobachtet. Gruppengehaltene Ncdn Mäuse beider Genotypen verbrachten gleich viel Zeit in aktiver Interaktion mit dem Artgenossen. Das gleiche Ergebnis lieferte auch die Untersuchung der sozialen Interaktion bei einzelgehaltenen Ncdn Mäusen.

Interessanterweise zeigten sich bei Ncdn Weibchen Unterschiede in der Quantität der sozialen Interaktion in Abhängigkeit der Haltungsbedingungen. Kontrollweibchen modulierten ihr soziales Interaktionsverhalten in Abhängigkeit der Haltungsbedingungen, denn einzelgehaltene verbrachten mehr Zeit in aktiver Interaktion als gruppengehaltene. Aber Ncdn ko Weibchen modulierten ihr Verhalten nicht in Abhängigkeit der Haltungsbedingungen, und verhielten sich somit im *Social Interaction* Test entsprechend den Ncdn Männchen.

Die fehlende Modulation aktiver sozialer Interaktion in Abhängigkeit der Haltungsbedingungen, sowie ein erhöhter sozialer Kontakt im mHB bei Ncdn ko Weibchen beruhten nicht auf einem funktionsunfähigen Geruchssinn. Erstens konnten zumindest einzelgehaltene Ncdn ko Weibchen wie die Kontrollen im *Social Discrimination* Test erfolgreich zwischen unbekanntem und bekanntem Artgenossen unterscheiden. Dieses legte nahe, dass Ncdn ko Weibchen ein intaktes Sozialgedächtnis für Artgenossen haben, welches

wiederum die Detektion der Pheromone von Artgenossen bedingt. Zweitens ergab der Test zur Wahrnehmung des Geruchs eines Artgenossen, dass alle Ncdn Mäuse – beide Geschlechter, beide Genotypen – die Streu des Artgenossen von neutraler Streu unterscheiden und somit alle Ncdn Mäuse Pheromone wahrnehmen konnten.

Zusätzlich zeigte sich *auch* im *Social Discrimination* Test, dass sich Ncdn ko Weibchen unter bestimmten Bedingungen wie Männchen verhalten. Denn in Einzelhaltung diskriminierten nur Ncdn Kontrollweibchen erfolgreich, Ncdn Männchen und Ncdn ko Weibchen nicht. Schlussfolgernd verschiebt Einzelhaltung die Balance zwischen Quantität und Qualität des Explorationsverhaltens im *Social Discrimination* Test in Richtung *Exploration ohne* Diskriminationsverhalten. Gruppenhaltung begünstigt dagegen bei gleichem Explorationsniveau das *Diskriminationsvermögen*, zumindest bei der Ncdn Mauslinie und diesem Testprotokoll.

Warum einzelgehaltene Ncdn ko Männchen im Vergleich zu Kontrollmännchen keine positive Diskriminationsleistung im *Social Discrimination* Test zeigten, bleibt zu klären. Es ist möglich, dass eine positive Diskriminationsleistung nicht detektiert werden konnte, da Ncdn ko Männchen insgesamt geringere Explorationszeiten im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen. Bei dieser Performance könnte eine positive Diskriminationsleistung nicht sichtbar geworden sein. Unterstützt wird diese Annahme von der Tatsache, dass die Ncdn Mutation auf einem gemischten 129Sv x B6J Hintergrund in der zweiten Generation auf B6J rückgekreuzt worden war. Und 129 Männchen haben im Vergleich zu B6J einen niedrigeren Gesellschaftstrieb und zeigen im Beisein eines bekannten Artgenossen keine Präferenz für einen ihnen unbekanntem Artgenossen (Moy et al. 2007).

Ferner unterstützte die *tendenziell* positive Diskriminationsleistung von einzelgehaltenen Ncdn ko Männchen die Wertung der Daten. Ein Einfluss der Mutation auf das (Sozial-)Gedächtnis bei Ncdn ko Männchen wird aber nicht ausgeschlossen. Erstens ist Neurochondrin u.a. in der Amygdala und im Hippocampus exprimiert (Istvanffy et al. 2004), zwei Hirnregionen, die eine Schlüsselrolle bei der Wiedererkennung von Artgenossen spielen (Bielsky and Young 2004; Richter et al. 2005). Zweitens zeigt parallel die konditionale Neurochondrin Mutante schlechteres Lernverhalten im räumlich-visuellen Test (Dateki et al. 2005). Für die Verifizierung eines möglichen Einflusses der Gene-Trap Ncdn-Mutation auf (soziales) Lernverhalten in Männchen sollten Ergebnisse des *Social Discrimination* Tests reproduziert werden. Ferner sollten eine Reihe weiterer Lern- und Gedächtnistests, wie z.B.



der *Object Recognition* und der *Morris Water Maze* Test, durchgeführt werden. Dabei wäre die Untersuchung des Phänotyps auf einem reinen B6J Hintergrund anstelle des gemischten Hintergrunds zu bevorzugen.

Insgesamt scheint die Verarbeitung olfaktorischer Informationen bei *Ncdn* Mutanten verändert zu sein. Zusätzlich ergibt sich ein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen in der Verarbeitung olfaktorischer Informationen in Abhängigkeit der Haltungsbedingungen. Soziale Interaktionen scheinen für einzelgehaltene *Ncdn* Kontrollweibchen lohnender zu sein, aber nicht für mutante Weibchen und nicht für Männchen. Die Tatsache, dass soziale Deprivation ein stärkeres Streben nach Belohnung hervorruft, ist von Ratten bekannt (Bardo et al. 2001; Green et al. 2002; Stairs et al. 2006). Somit stellt sich die Frage, ob Neurochondrin geschlechtsspezifisch auf das Belohnungssystem wirkt, denn es wird sowohl in der Schalen- wie auch der Kernregion des *Nucleus accumbens* exprimiert (Istvanffy et al. 2004), der im Belohnungssystem eine zentrale Rolle einnimmt. Hier ist der *Nucleus accumbens* in die Verarbeitung von Informationen involviert, die der motivgesteuerten Kontrolle von zielgerichtetem Verhalten unterliegen (Becerra et al. 2001; Wise 2004; Ventura et al. 2007). *In vivo* Unterschiede in der Aktivierung des Belohnungssystems bei *Ncdn* Mäusen könnten mit fMRI (funktionelle Magnetresonanztomographie) visualisiert werden (Kuriwaki et al. 2004; Liu et al. 2007). Konzeptionell sollten einzeln- und gruppengehaltenen *Ncdn* Mäusen beider Genotypen und Geschlechter zwei olfaktorische Stimuli – Duft eines weiblichen und männlichen Artgenossen – während der Messzeit präsentiert werden. Eine entsprechende Kooperation mit Herrn Dr. E. Chereul von ANIMAGE/Lyon ist bereits angelaufen. Ferner sollten die *Ncdn* Mäuse in Abhängigkeit der Haltungsbedingungen in einem positiven/appetitiven bzw. negativen/aversiven Operanten Konditionierungstests, bezüglich Unterschieden im belohnungsmotiviertem Verhalten, untersucht werden. Mit der *Five Choice Box* ist ein appetitiv verstärkter Lerntest im Verhaltensscreen bereits etabliert (Holter et al. 2005). Da dieser Test aber mit einem Protokoll von mehreren Monaten und täglichem Training aller Tiere verbunden ist und damit zu den so genannten Tertiärtests zählt, sollte sich eine Untersuchung der *Ncdn* Mauslinie auf fundierte Daten der fMRI stützen.

Parallel dazu wären Untersuchungen an den Neuropeptiden Oxytocin und Vasopressin sowie ihren Rezeptoren interessant, da beide Peptide in der Verarbeitung, Abruf des sozialen Gedächtnisses, sowie in der Ausbildung sozialer Bindungen entsprechend der belohnenden

Komponente sozialer Interaktionen eine Schlüsselrolle spielen (Young 2001; Bielsky and Young 2004; Keverne and Curley 2004; Smeltzer et al. 2006).

Zusammenfassend ergab die Analyse der Ncdn Mauslinie, dass die Primärphänotypisierung 2003, die Veränderungen im Sozialverhalten und Angstverhalten bei mutanten Weibchen ergab, erfolgreich reproduziert wurde. Die Abgrenzung der beiden Verhaltensdimensionen Sozialverhalten und Angstverhalten gegeneinander mit mehreren Batches von Ncdn Mäusen und mittels *Konzeptunterschieden hinsichtlich der mHB-Versuchsdurchführung*, sowie spezifischeren Angst- und Sozialverhaltenstests zeigte, dass bei den Ncdn Mutanten Weibchen ein Sozialverhalten-Phänotyp vorlag. Dieser Phänotyp beeinflusste sekundär die Angstparameter im mHB. Weitere Analysen hinsichtlich des sozialen Verhaltens und gegebenenfalls hinsichtlich des Lernens sollten bei dieser Mauslinie folgen.

Allgemein wurde bei der Analyse der Ncdn Linie deutlich, dass das mHB im Verhaltensscreen nicht nur als Primärtest nützt, sondern ebenfalls bei weiterführenden Fragestellungen detaillierte Informationen liefert.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

### **Evaluation des modified Hole Boards als Primärscreen für mutante Mauslinien**

Im Zuge der Untersuchung von Genen ist die Aufklärung ihrer Funktionen Gegenstand der heutigen biomedizinischen Forschung. Hierbei sind mutante Mauslinien prädestiniert, um detaillierte Einsichten in die Korrelation von Genotyp und Phänotyp zu gewinnen. Mit der German Mouse Clinic ist ein Phänotypisierungszentrum gebaut worden, in welchen mutante Mauslinien effizient, standardisiert und mit hoher Durchlaufleistung auf einen potentiellen Phänotyp hinsichtlich aller Körpersysteme untersucht werden können. In diesem Kontext wird im Verhaltensmodul zur Detektion potentieller Verhaltensphänotypen der modified Hole Board Test nach Ohl (Ohl et al. 2001a; Ohl et al. 2001b) verwendet, da mit diesem verschiedene Verhaltensdimensionen der Maus in nur einem einzigen kurzen Test dargestellt werden können. Basierend auf dieser Primärphänotypisierung wird dann eine der jeweiligen Mauslinie angepasste Folgeanalyse durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Validierung des mHBs, um sicherzustellen, dass dieser Test im Verhaltensmodul reproduzierbare und für die Analyse von Mausmutanten aufschlussreiche Daten liefert.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der mHB Test mit dem bekannteren *Open Field* Test verglichen. Von Interesse war, ob die Verhaltensdimensionen Lokomotion und Angst von C3HeB/FeJ und C57BL/6J Mäusen beider Geschlechter in beiden Tests miteinander verglichen werden können. Die Daten zeigten, dass das mHB die Lokomotion in beiden Stämmen erhöhte. Dennoch sind die Aussagen hinsichtlich der lokomotorischen Aktivität in beiden Tests miteinander vergleichbar. Im Gegensatz dazu sind Aussagen über Angstverhalten aus beiden Tests nicht direkt miteinander vergleichbar, denn das Angstverhalten wurde in komplexer Interaktion von Stamm und Geschlecht mit beeinflusst. Zusammenfassend sind die *Baselinielevels* für Angstverhalten im mHB dennoch hoch genug, um anxiogene Effekte von z.B. Genmanipulationen detektieren zu können. Ferner zeigte sich, dass die Angstparameter „Latenz bis zum ersten Zentrum-Eintritt“ und die „Anzahl der Eintritte ins Zentrum“ lokomotionsabhängig sind und im Gegensatz zu der „verbrachten Zeit im Zentrum“ als sekundäre Angstparameter angesehen werden sollten. Da C3H erblinden, wurde anschließend der Einfluss von Blindheit auf das unconditionierte Verhalten im mHB

untersucht. Die Analyse von sehenden C3H.Pde6b+ Mäusen im Vergleich zu blinden C3H/HeH Mäusen zeigte, dass intakte Sehfähigkeit einen früheren Gebrauch des Verhaltenrepertoires in neuer Umgebung ermöglicht. Sie zeigte zudem, dass die Aktivitätslevel und das Objektgedächtnis unabhängig von der Sehfähigkeit sind. Schlussfolgernd sind aussagekräftige Beurteilungen der Sehfähigkeit für die korrekte Interpretation von Verhaltensdaten sinnvoll und sollten grundlegender Teil jeder Phänotypisierungsstrategie sein.

Da bekanntermaßen Haltungsbedingungen Verhalten der Mäuse beeinflussen, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit die akustisch dämpfenden und Klettermöglichkeiten reduzierenden Einflüsse der IVC-Haltung in der GMC im Vergleich zu konventioneller Haltung untersucht. Analysiert wurden einzelgehaltene C3H und B6J Männchen in beiden Haltungen und in IVCs mit zusätzlichen Klettermöglichkeiten. Dabei wurde erstens festgestellt, dass IVC-Haltung aktivitätssenkend und angststeigernd auf unkonditioniertes Verhalten einzelgehaltener Männchen wirkt. Zweitens, dass die Einflüsse der IVC-Haltung nicht nur auf Effekte im mHB beschränkt sind. So erhöht IVC-Haltung stammspezifisch den akustischen Schreckreflex bei C3H Männchen und erleichtert das Furchtlernen bei B6J Männchen, letzteres allerdings nur, wenn zusätzliche Klettermöglichkeiten in IVCs vorhanden waren. Schlussfolgernd erschwert IVC-Haltung die Detektion von angststeigernden genetischen Effekten bei einzelgehaltenen Männchen dieser Stämme. Untersuchungen an Mäusen beider Stämme und Geschlechter in *Gruppenhaltung* zeigten aber auch, dass IVC-Haltung positiv auf unkonditioniertes Verhalten im mHB wirken kann. Denn IVC-gruppengehaltene B6J Weibchen zeigten reduziertes Angstverhalten im Vergleich zu konventionell gehaltenen. Insgesamt hebt Gruppenhaltung bei C3H Männchen die meisten IVC-Effekte auf, was nicht für B6J Männchen gilt. Zwar verstärkte IVC-Haltung *Grooming* in Männchen beider Stämme. Aber nur IVC-gruppengehaltene B6J Männchen zeigten entsprechend den einzelgehaltenen reduzierte Lokomotion und erhöhtes Angstverhalten. Interessanterweise war die soziale Affinität beider Stämme und Geschlechter unabhängig von den Haltungsbedingungen, was nahe legt, dass diese Verhaltensdimension robust ist gegenüber Einflüssen von Umweltbedingungen, zumindest jener in dieser Arbeit untersuchten. Schlussfolgernd sind IVC-Haltungseffekte nicht zu verallgemeinern, da sie sowohl von Stamm, Geschlecht als auch von der Gruppengröße im Käfig abhängen. Das Wissen um ihre Effekte ist aber notwendig, um entsprechend der wissenschaftlichen Fragestellung die optimalen Experimentbedingungen wählen zu können.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Nützlichkeit des mHBs im Verhaltensprimärscreen der GMC analysiert. Dabei galt es bereits publizierte, d.h. bekannte Verhaltensphänotypen mit Hilfe des mHB zu bestätigen. Hierzu wurden der Inzuchtstamm PWD/Ph (Fernandes et al. 2004) und die mutante Mauslinie CRHR1 ko (Timpl et al. 1998) *reanalysiert*. Dabei bestätigte die mHB-Analyse geringeres Angst-, sowie intensives *Grooming*-Verhalten und erhöhte Objektexploration von PWD/Ph Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J. Ferner wurden alle Befunde auf Weibchen ausgedehnt. Die mHB-Analyse der CRHR1 ko Mauslinie detektierte ebenfalls erhöhte Lokomotion und reduziertes Angstverhalten, wenn auch nicht im gleichen Maße wie bereits veröffentlicht. Zusammenfassend zeigte die Phänotypenreproduktion, dass das mHB im Verhaltensscreen sensitiv für die Detektion von Verhaltensphänotypen ist und valide, also reproduzierbare und vergleichbare Daten, liefert. Über diesen Vergleich hinaus zeigte eine zusätzliche statistische Analyse der bis dato 62 im mHB untersuchten mutanten Mauslinien, dass das mHB eine bedarfsgerechte Spannweite zur Phänotypendetektion im Primärscreen liefert. Das mHB detektiert interessante Phänotypen, impliziert aber nicht übersensitiv in *allen* Mauslinien einen potentiellen Verhaltensphänotyp. Denn es konnten 77% der Mauslinien mit Änderungen der mHB Parameter einem Phänotyp zugeordnet werden, die restlichen 23% nicht. Die qualitative Erfassung der Phänotypen zeigte, dass hauptsächlich Phänotypen mit Änderungen der Lokomotion und Aktivität detektiert werden. Seltener zeigen sich im mHB spezifische Änderungen wie z.B. nur Änderungen im vertikalen Explorationsverhalten. Ferner legte die quantitative wie auch die qualitative Auswertung nahe, dass die Phänotypisierung beider Geschlechter berechtigt ist. Denn 30% der Verhaltensphänotypen hätten im mHB nicht detektiert werden können, wenn nur Männchen untersucht worden wären. Zusammenfassend bietet das mHB erwiesenermaßen einen leistungsstarken und effizienten Primärscreen.

Im letzten Punkt der Arbeit wurde anhand der mutanten Mauslinie Neurochondrin deren Phänotypisierung über den Primärscreen hinaus dargestellt. Die Analyse in dieser Arbeit ergab, dass der bereits 2003 im mHB identifizierte potentielle Angst- bzw. Sozialverhaltensphänotyp bei mutanten Weibchen reproduziert werden konnte. In weiteren Analysen wurden beide Verhaltensdimensionen gegeneinander abgegrenzt. Es zeigte sich, dass Neurochondrin Mutanten beider Geschlechter unter den hier gegebenen Bedingungen keinen Angstphänotyp aufweisen. Bei mutanten Weibchen wurde ein Defizit in sozialer Interaktion festgestellt. Während in Anhängigkeit der Haltungsbedingungen Kontrollweibchen ihre sozialen Interaktionen modulierten, taten mutante Weibchen dieses nicht und verhielten sich wie Männchen. Bei mutanten Männchen konnte in der hier

vorliegenden Arbeit ein mögliches Defizit, bekannte von unbekanntem Artgenossen unterscheiden zu können, nicht ausgeschlossen werden. Diesen Änderungen des Sozial- und Lernverhalten von Neurochondrin knockout Mäusen sollten weitere Analysen folgen. Bei der Analyse der Neurochondrin Mauslinie wurde das mHB über den Primärscreen hinaus eingesetzt, um mittels konzeptioneller Unterschiede im Versuchsansatz die Verhaltensdimensionen Angst- und Sozialverhalten bei mutanten Neurochondrin Weibchen besser dissoziieren zu können. Dabei wurde deutlich, dass das mHB bei weiterführenden Analysen detaillierter Fragestellungen eingesetzt werden kann.

Insgesamt zeigte diese Arbeit, dass das mHB im Primärscreen der GMC erfolgreich etabliert werden konnte und seitdem im eigenen Labor eine valide Verhaltensphänotypisierung gewährleistet.

Abschließend belegte die vorliegende Studie erstmalig anhand von Daten, dass das mHB in einem auf hoher Durchlaufleistung beruhenden Phänotypisierungslabor die standardisierte primäre Verhaltensanalyse verschiedener Arten mutanter Mauslinien ermöglicht, und aufgrund seiner Effizienz die Methode der Wahl darstellt.

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Tiere und Tierhaltung

Alle in dieser Studie verwendeten Mäuse wurden in der German Mouse Clinic (GMC) untersucht. Die Temperatur betrug 22 bis 24 °C, die Luftfeuchtigkeit 50 bis 60% und die Luftwechselrate 20 pro Stunde. Es herrschte ein 12/12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit Licht an um 7 Uhr. Als Streu dienten den Mäusen Holzspäne (Altromin, Lage, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 1,5 bis 2 cm und bei einzelgehaltenen Mäusen zusätzlich ein Tissuepapier (20 cm x 21 cm, KIMWIPES<sup>®</sup> Lite 200). Alle Mäuse bekamen *ad libitum* Standardfutter (1314, Altromin) sowie Trinkwasser (0,2 µl filtriertes Leitungswasser) und wurden entsprechend den FELASA Richtlinien auf Mikroorganismen getestet (Kraft et al. 1994; Nicklas et al. 2002). Alle hier durchgeführten Tierexperimente wurden von der für Tierschutz zuständigen Stelle der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Mäuse folgender Stämme wurden je in der GMC gezüchtet und aufgezogen: C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6) sowie blinde C3H/HeH und sehende C3H.Pde6b+ als auch PWD/PH. Die Mäuse wurden in jeweils einzeln ventilierten Käfigen, so genannten IVCs (Individually Ventilated Cages), wie sie vom Hersteller geliefert wurden (IVC, VentiRacks<sup>™</sup>, BioZone, Margate, UK), geboren. Nach dem Absetzen im Alter von 3 Wochen wurden männliche und weibliche Mäuse nach Stamm und Geschlecht getrennt in Gruppenhaltung (n = 5) in IVCs gehalten (IVC classic) (**Abb. 5 c** der Einleitung). Ein Teil der für die Haltungsbedingungen verwendeten Mäuse wurden im Alter von 8 Tagen mit den Muttertieren in andere Käfige (Conventional, bzw. IVC grid, **Abb. 5a, b** der Einleitung) umgesiedelt (siehe 5.3.2).

Die CRHR1 knockout Mauslinie wurde am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München in konventioneller Haltung gezüchtet und gehalten. Der knockout erfolgte durch gezielte Unterbrechung des CRHR1 Gens (Deletion der Exons 9-13) mittels homologer Rekombination in ES Zellen (Timpl et al. 1998). Die hier untersuchten Mäuse wurden auf einem gemischten C57BL/6J x 129SvEvTac x CD1 Hintergrund gezüchtet. Im Alter von 3 Wochen wurden sie nach Geschlecht und Genotyp auf die Käfige (30 x 20 x 14 cm) verteilt.

Es herrschte ein 12/12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit Licht an um 7 Uhr, 22 °C Raumtemperatur und 60% Luftfeuchtigkeit. Als Standardfutter dienten wie im GMC Futterpellets (1314, Altromin). Sie wurden im Alter von 10-17 Wochen ins GMC importiert und hatten 2 Wochen zum Akklimatisieren. Dabei saßen die Männchen in Einzelhaltung, nachdem sie am Max-Planck-Institut im *Forced Swimming* Test getestet und anschließend einzeln gesetzt wurden, die Weibchen in Gruppenhaltung ohne vorherige Testerfahrung.

Die Neurochondrin Mauslinie (W04406) wurde am Institut für Entwicklungsgenetik an der GSF in Neuherberg im Rahmen des Gene-Trap Consortiums (GGTC) (<http://www.genetrap.de/>) in konventioneller Haltung im Isotopenhaus bzw. in der DoBe (Doppelte Bestrahlung) gezüchtet und aufgezogen. Die Random-Integration des Gene-Trap Vektors *pTlbgéo* in die 3'UTR des *ncdn* Gens, das auf dem Mausechromosom 4 sitzt und aus 7 Exons besteht, in TBV-2 (ES Zellen von 129S2 = 129/SvPas) ergab ein Fusionstranskript, in welchem Exon 7 nicht transkribiert und translatiert wurde (K. Maruyama, Dissertation R. Istvánffy, nicht publiziert). Die hier untersuchten Mäuse waren auf 129Sv Hintergrund und bis in die zweite Generation auf C57BL/6J rückgekreuzt. Nach dem Absetzen wurden die Mäuse getrennt nach Geschlecht, aber nicht nach Genotyp, in Gruppen (n = 5) bei *ad libitum* Standardfutter (1314, Altromin) sowie Trinkwasser bei 22 bis 24 °C und 50 bis 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Es herrschte ein 12/12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit Licht an um 7 Uhr. Für die jeweiligen Verhaltensuntersuchungen wurden die Neurochondrin Mäuse in die GMC importiert und entsprechend den Standards der GMC gehalten. Die importierten Mäuse hatten vor Beginn der Verhaltenstests mindestens zwei Wochen Akklimatisationszeit.

## 5.2 Verhaltenstests

### 5.2.1 Allgemeines

Alle Tests, außer die *Startle* Versuche, fanden im Tierhaltungsraum statt und wurden auf Video aufgezeichnet. Für die *Startle* Versuche wurden die Mäuse eine halbe Stunde vor Testbeginn in einen Tierhaltungsraum neben dem *Startle*-Testraum gebracht. Nach der Akklimatisationsphase wurden die Mäuse in die Haltevorrichtung gesetzt (siehe 5.2.6) und im Raum nebenan in die *Startle* Boxen gesetzt. Die Durchführung der Tests erfolgte zwischen 8.00 und 16.00 Uhr.



### **5.2.2 modified Hole Board**

In der mHB Testvorrichtung wurden zwei Tests miteinander vereint: das *Open Field* und das *Hole Board*. Der *Open Field* Test greift die Lokomotion von Nagetieren ab (s. 5.2.3) und das *Hole Board* dient in seiner Ursprungsversion der Untersuchung des explorativen Verhaltens bei Nagern (File and Wardill 1975b; File and Wardill 1975a).

Sowohl das mHB (**Abb. 3** der Einleitung) als auch der Test wurden in einer modifizierten Version, basierend auf der Beschreibung von Ohl et al. (Ohl et al. 2001a; Ohl et al. 2001b; Ohl et al. 2001c), verwendet: Das *Board*, das das Zentrum der Testarena repräsentierte, bestand aus undurchsichtigem grauen Polyvinylchlorid (PVC; 60 x 20 x 2 cm) mit 23 eingestanzten Löchern (1.5 x 0.5 cm), die in drei Reihen versetzt angebracht waren. Die Löcher auf dem *Board* wurden mit beweglichen Kappen, die aus dem gleichen Material wie das *Board* bestanden, bedeckt. Das *Board* wurde in die Mitte einer undurchsichtigem grauen PVC Box (100 x 50 x 50 cm), der Testarena, platziert und repräsentierte somit den zentralen Bereich eines Open Fields. Vor Beginn eines jeden Durchlaufs (= Trial) wurden alle Kappen geschlossen. Der Außenbereich (*Box*) um das *Board* wurde durch weiße Linien (Klebeband), die auf den Boden der Testarena geklebt wurden, in 12 gleichgroße Quadrate (20 x 16 cm) unterteilt. Abweichend von der Originalstudie wurde in dieser an Stelle von Futter pro Trial ein unbekanntes Objekt (ein blauer Plastikschraubdeckel, Durchmesser 2 cm, Höhe 1 cm) und eine Kopie eines bekannten Objekts (ein Metallkubus, Durchmesser 2 cm, Höhe 1,5 cm; für 48 h im Heimkäfig der Tiere, 24h vor dem Test entfernt) in die gleiche Ecke der Testarena mit einem Abstand von 2 cm platziert. Direkt an die Testarena grenzte das Gruppenkompartiment (50 x 50 cm), das von der Testarena mittels einer durchsichtigen, mit 120 Löchern (1 cm Durchmesser) in 12 Reihen perforierten PVC Trennwand (50 x 50 x 0.5 cm) abgeteilt war. Für **Gruppentestung** wurde die soziale Gruppe, also alle Tiere eines Heimkäfigs, für 20 Minuten Habituationszeit ins Gruppenkompartiment gesetzt. Nach der Habituation wurde jedes Tier einzeln in die Testarena gesetzt während die Käfigpartner im Gruppenkompartiment präsent blieben. Dies ermöglichte dem jeweiligen Testtier olfaktorischen und visuellen Kontakt zu seiner sozialen Gruppe während der Testsession, was den Stress des Testtieres während dieser reduzieren sollte.

Für **Einzeltestung** wurde das Gruppenkompartiment des mHBs nicht benutzt, der durchsichtige Raumteiler durch eine undurchsichtige graue PVC Wand ersetzt und jedes Testtier direkt aus dem Heimkäfig in die Testarena gesetzt. Bei Gruppen- als auch Einzeltestung lag die Startposition in dem Quadrat, das sich genau entgegengesetzt zu der

Ecke mit den zwei Objekten befand, die Tiere wurden mit der Nase diagonal zum *Board* eingesetzt und für jeweils 5 Minuten in moderaten Lichtverhältnissen (von 150 Lux in den Ecken bis zu 200 Lux in der Mitte der Testarena) getestet. Nach jedem Trial wurde die Testarena gesäubert und mit Pursept desinfiziert. Das getestete Tier kam bei Gruppentestung mit schwarzem Edding am Schwanz markiert zurück ins Gruppenkompartiment oder bei Einzeltestung direkt in den Heimkäfig. Alle Trials wurden mit Hilfe vom **Trackingsystem** Ethovision 2.3 (Noldus, Wageningen, NL) im Hinblick auf die Bewegung/Lokomotion analysiert: Berechnung der gelaufenen Gesamtstrecke, durchschnittlicher und maximaler Geschwindigkeit sowie Eintritte ins Zentrum = *Board*-Eintritte, Latenz bis zum ersten *Board*-Eintritt und Gesamt- u. Maximalaufenthaltsdauer auf dem *Board*. Wechsel vom Außenbereich (*Box*) aufs *Board* und vice versa wurde vom System gemessen, sobald der Körpermittelpunkt des Tieres die markierte virtuelle Zonengrenze passierte. Die Schwelle für Bewegungsdetektion wurde auf 1 cm gesetzt, d.h. der Körpermittelpunkt des Tieres musste sich um mindestens 1 cm in horizontaler Richtung bewegen, um vom System als Bewegung wahrgenommen zu werden, die Abtastungsrate (*sample rate*) betrug dabei 12500 pro Sekunde. Ein **tragbarer Computer** diente dem trainierten Beobachter, der neben dem Gruppenkompartiment saß, zum direkten Aufzeichnen von Linienübertritten, *Board*-Eintritten, *Rearings* (= vertikales Sich-Aufrichten auf die Hinterbeine zur olfaktorischen Erkundung der Umgebung, vertikale Exploration) auf dem *Board*, *Rearings* in der *Box*, Exploration der Löcher (gerichtete Exploration), Öffnen der Löcher (Hole visit), Exploration von unbekanntem und bekanntem Objekt [Objektindex = Zeit am unbekanntem Objekt/(Zeit am bekannten + unbekanntem Objekt); wenn der Quotient > 0 ist, dann wurde das unbekannte Objekt länger exploriert), Regungslosigkeit, komplett durchgestreckte Körperhaltung (= *stretched attends*), Kotabsatz und Reinigen des Fells (*Grooming*). Linienüber- und *Board*-Eintritte wurden gezählt, wenn das Tier mit allen vier Pfoten die Line überschritten bzw. das *Board* betreten hatte. Da für den Übertritt ins Zentrum und zurück die manuelle Erfassung ein strengeres Kriterium als das Tracking-System benutzte (Tier mit alle vier Pfoten vs. Körpermitte der Maus, s.o.), wurden diese Messungen für der Auswertungen benutzt. Dabei bildeten die Kapitel 2.1.1 und 2.1.2 eine Ausnahme: da für das Open Field auf manuelles Erfassen des Verhaltens verzichtet wurde, wurden somit auch die entsprechenden mHB Daten hier mit Ethovision ausgewertet. Die vom Beobachter aufgenommenen Daten wurden mit Hilfe der Observer Software 4.1 (Noldus, Wageningen, NL) im Hinblick auf Häufigkeit, Latenz bis zum ersten Auftreten und prozentuale Dauer in Bezug zur Gesamtbeobachtungszeit ausgewertet.

**Tabelle 2** fasst die im mHB ermittelten Verhaltensdimensionen mit den gemessenen Verhaltensparametern zusammen.

<b>Tabelle 2: Im modified Hole Board erhobene Verhaltensdimensionen mit den dazugehörigen gemessenen Parametern</b>	
<i>Verhaltensdimension</i>	<i>Gemessene Parameter</i>
Vorwärtslokomotion / Lokomotorische Aktivität	gelaufene Strecke, Linienübertritte (Latenz, Anzahl)
Geschwindigkeit	Durchschnitts- und Maximalgeschwindigkeit
Vertikale/ungerichtete Exploration	<i>Rearings</i> in der Box und auf dem <i>Board</i> (Latenz, Anzahl)
Horizontale/gerichtete Exploration	Explorierte Löcher (Latenz, Anzahl); exploriertes bekanntes und unbekanntes Objekt (Latenz, Anzahl, Zeit in %)
Risikoabschätzung	<i>Stretched attends</i> (Latenz, Anzahl)
Angstkorreliertes Verhalten	Betreten des <i>Boards</i> (Latenz, Anzahl, Zeit in %); Abstand zur Wand und zum <i>Board</i>
<i>Grooming</i> -Verhalten	<i>Grooming</i> (Latenz, Anzahl, Zeit in %)
Defäkation	Kotabsätze (Latenz, Anzahl)
Soziale Affinität	Sozialen Kontakte an der transparenten Trennwand (Latenz, Anzahl, Zeit in %)
Objekterkennung	Objektindex

### 5.2.3 Open Field

Das *Open Field* zusammen mit dem *Elevated Plus Maze* (s. 5.2.4) und der *Light Dark Box* (s. 5.2.5) werden zur Evaluation von angstkorreliertem Verhalten in Mäusen verwendet (Crawley 1999b).

Im *Open Field* Test befinden sich die Mäuse in einer ihnen unbekanntem Umwelt und damit in einer unkonditionierten Konfliktsituation zwischen den natürlichen Tendenzen zur Exploration einerseits und Vermeidung offener Flächen andererseits. Daher ermöglicht das *Open Field* die Untersuchung von Lokomotion, Explorationstrieb, Reaktivität auf Neues und Emotionalität (Halcomb et al. 1975; Clement et al. 1997; Crawley 1999b; Prut and Belzung 2003). Das *Open Field* bestand aus einer rechteckigen Arena (48,5 x 48,5 x 38 cm) von undurchsichtigem grauen PVC (**Abb. 4** der Einleitung). Die Arena wurde virtuell in eine periphere Zone und ein Zentrum (45% der Gesamtfläche) unterteilt. Dabei entsprach die Peripherie einer Fläche, die von den Seitenwänden begrenzt wurde und eine Breite von 8 cm hatte. Die Tiere wurden mit der Nase zur Wand in die Mitte der Wandlänge eingesetzt und für jeweils 5 Minuten in moderaten Lichtverhältnissen getestet (180-200 Lux). Der Experimentator verließ für die Testphase den Testraum. Alle Trials wurden mit Hilfe des **Tracking-Systems** Ethovision 2.3 (Noldus, Wageningen, NL) hinsichtlich der gelaufenen

Gesamtstrecke aufgenommen. Zusätzlich wurden die Anzahl der Eintritte in das Zentrum, die Latenz bis zum ersten Eintritt und die prozentuale Aufenthaltsdauer im Zentrum in Bezug zur Gesamtbeobachtungszeit ausgewertet. Die Schwelle für die Bewegungsdetektion wurde auf 1 cm gesetzt, d.h. der Körpermittelpunkt des Tieres musste sich um mindestens 1 cm in horizontaler Richtung bewegen, um vom System als Bewegung wahrgenommen zu werden, die Abtastungsrate (sample rate) betrug dabei 12 500 pro Sekunde. Zonenwechsel wurde vom System gemessen, sobald der Körpermittelpunkt des Tieres die virtuelle Zonengrenze passierte. Sowohl die Anzahl der Eintritte als auch die Zeit im Zentrum dienten als Maß des emotionalen Status des Tieres. Nach jedem Trial kam das getestete Tier mit schwarzem Edding am Schwanz markiert zurück in den Heimkäfig, die Testarena wurde gesäubert und mit Pursept desinfiziert. Dieses Protokoll basiert auf dem Eumorphia Protokoll (siehe <http://www.eumorphia.org>).

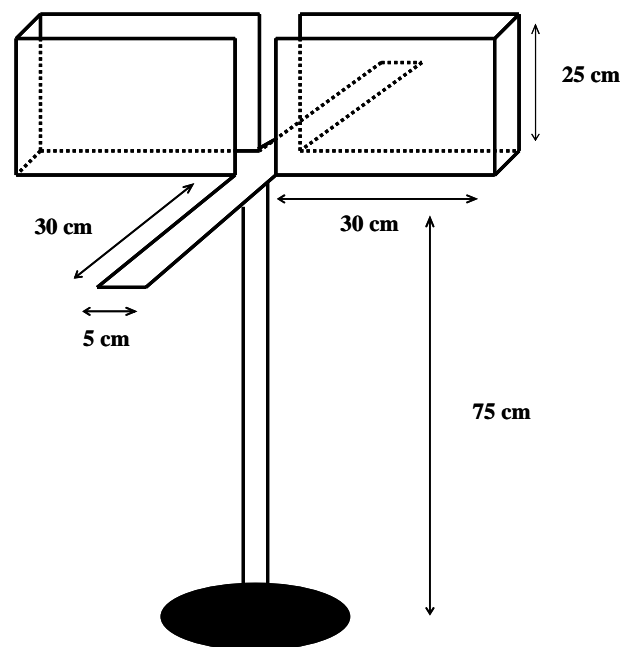
### 5.2.4 Elevated Plus Maze

Im *Elevated Plus Maze* Test (EPM) (Pellow et al. 1985) (**Abb. 26**) ist das Tier wie im *Open Field* in einer unkonditionierten Konfliktsituation zwischen Exploration dieser neuer Umgebung einerseits und seiner Vorsicht/Angst vor offenen und hier *gleichzeitig* erhöhten Flächen (= offene Arme) andererseits (Lister 1987; Fernandes and File 1996; Hogg 1996). Damit dient die Exploration der offenen Arme der EPM als Maß für Emotionalität: Je geringer die Exploration, desto höher die Ängstlichkeit.

Die plusförmige Arena bestand aus hellgrauem Kunststoff und war auf einem Metallständer stehend 75 cm über dem Boden angebracht. Zwei sich gegenüberliegende Arme waren je von 25 cm hohen Seitenwänden umgeben (= geschlossene Arme), die beiden anderen Arme besaßen nur eine 0.2 cm hohe Kante (= offene Arme). Die vier gleichlangen und breiten Arme (30 cm x 5 cm) waren durch ein Zentrum von 5 cm x 5 cm verbunden (= neutrale Zone). Damit die Mäuse den Halt nicht verlieren, wurde der Boden mit Schleifpapier angeraut. Die Ausleuchtung fand zentral von oben so statt, dass die Wände keine Schatten warfen (100 Lux in der neutralen Zone, 60 Lux in den Enden der geschlossenen, 75 Lux in den Enden der offenen Arme). Zu Beginn jeden Testgangs wurde die Maus in die neutrale Zone mit Blick Richtung eines der geschlossenen Arme gesetzt. Vom Nebenraum aus wurde das Verhalten der Maus von einem trainierten Beobachter am Monitor mit Hilfe eines **tragbaren Computers** festgehalten. Gezählt wurden Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme bzw. in die neutrale Zone, wobei ein Eintritt das Setzen aller vier

Pfoten in den betreffenden Bereich bedeutete. Die Daten wurden mit Hilfe der Observer Software 4.1 (Noldus, Wageningen, NL) im Hinblick auf (1) die Anzahl der Eintritte in die offenen bzw. geschlossenen Arme, (2) die Latenz bis zum ersten Eintritt in einen offenen Arm und (3) die auf den offenen sowie geschlossenen Armen verbrachte Zeit in Prozent bezogen auf die Gesamtbeobachtungszeit ausgewertet.

Aus (1) und (3) wurden in der Auswertung die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme in Prozent der Eintritte in alle Arme, sowie die auf den offenen Armen verbrachte Zeit in Prozent der auf allen Armen verbrachten Zeit berechnet. Nach dem Test wurde die Maus in den Heimkäfig gesetzt und die Apparatur mit Pursept desinfiziert.



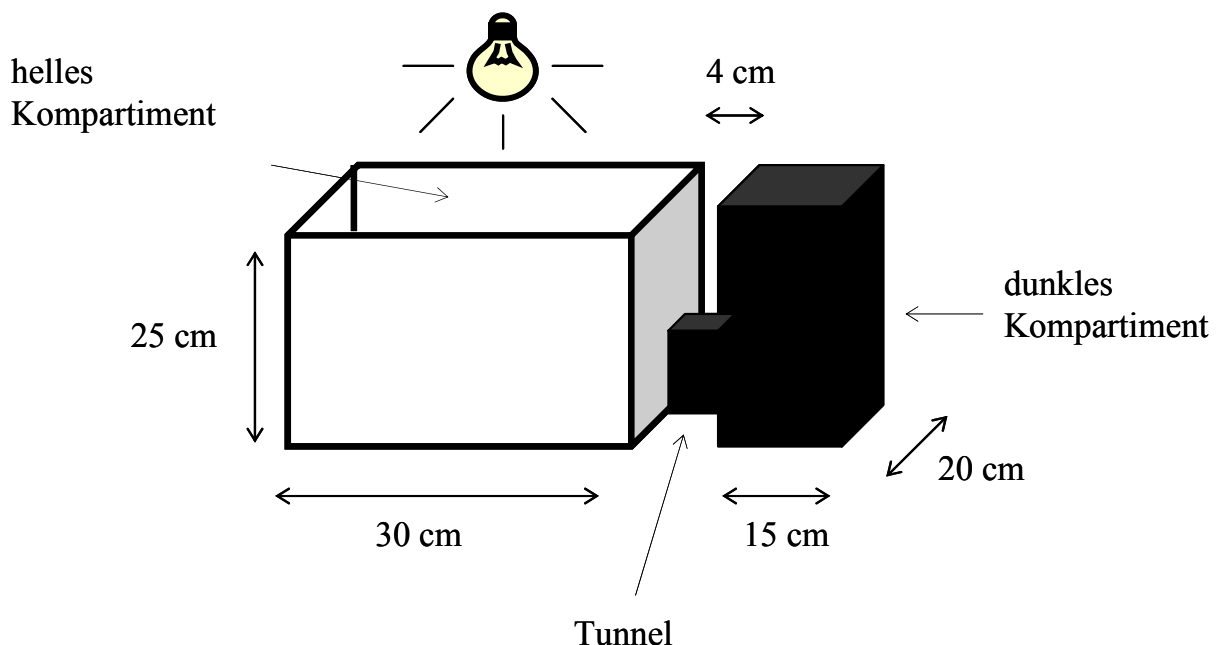
**Abbildung 26:** Das *Elevated Plus Maze* mit zwei offenen bzw. zwei geschlossenen Armen auf einem Metallgestell über dem Boden angebracht.

### 5.2.5 Light Dark Box

Auch im *Light Dark Box* Versuch (**Abb. 27**) (Crawley and Goodwin 1980; Crawley 1981; Bourin and Hascoet 2003) befindet sich das Tier in der Konfliktsituation Exploration versus Aversion gegen eine exponierte Fläche, bei der es sich hier um einen hellen und grell beleuchteten Raum handelt. Je erhöhter die Ängstlichkeit, desto geringer die Exploration dieses hellen Bereiches. Die Kunststoff- *Light Dark Box* war nach oben hin offen und in zwei unterschiedlich große Kompartimente unterteilt: ein großes weißes (30 x 20 x 25 cm) und ein kleines schwarzes (15 x 20 x 25 cm). Verbunden waren die Kompartimente durch einen oben

mit durchsichtigem Kunststoff geschlossenen Tunnel (4 x 7 x 10 cm). Der Kontrast zwischen beiden Kompartimenten wurde zusätzlich durch Beleuchtung des hellen Kompartiments mit einer Lichtintensität von 650 Lux in der Mitte und ca. 600 Lux in den Ecken verstärkt. Die Lichtintensität im dunklen Abteil betrug 65 Lux. Für den 5 Minuten Test wurde die Maus zu Beginn in das dunkle Kompartiment mit Kopf in Richtung des Tunnels gesetzt. Ein trainierter Beobachter, der neben der Box platziert war, zeichnete das Verhalten der Maus mit Hilfe eines **tragbaren Computers** auf. Erfasst wurden die Eintritte in das helle und dunkle Kompartiment sowie in den Tunnel. Dabei galt als Eintritt das Setzen aller vier Pfoten in das jeweilige Kompartiment. Die Daten wurden mit Hilfe der Observer Software 4.1 (Noldus, Wageningen, NL) im Hinblick auf (1) die Anzahl der Eintritte in das helle, (2) das dunkle Kompartiment und in den (3) Tunnel sowie (4) die Latenz zum ersten Eintritt ins helle Kompartiment und (5) die in den jeweiligen Kompartimenten verbrachte Zeit bezogen auf die Gesamtbeobachtungszeit ausgewertet.

Für die Auswertung wurde die Anzahl der Eintritte in das helle Kompartiment in Prozent der Gesamteintritte in den Tunnel und beider Kompartimente, sowie die im hellen Kompartiment verbrachte Zeit in Prozent der gesamten Testzeit von fünf Minuten berechnet.



**Abbildung 27: Die Light Dark Box:** helles und dunkles Kompartiment sind durch einen Tunnel miteinander verbunden.

### **5.2.6 Startle Tests**

Der akustische Schreckreflex (*Acoustic Startle Reflex* = ASR) misst sensorimotorisches Verhalten und wird in der Aufklärung von genetischen Effekten auf neuronale Mechanismen von Verhalten verwendet (Davis 1980; Crawley 1999b; Plappert and Pilz 2001). Die Verstärkung des Schreckreflexes durch konditionierte Furcht (*Fear Potentiated Startle* = FPS) wird benutzt, um kognitive Fähigkeiten zu messen. Gegenüber anderen Gedächtnistests hat dieser den Vorteil, dass er kurz und automatisiert ist und in Mäusen bereits validiert worden ist (Falls et al. 1997; Falls 2002).

Sowohl FPS (vgl. 5.2.6.1) als auch ASR (vgl. 5.2.6.2) wurden mit Hilfe der *Startle* Apparatur und Software von Med Associates Inc. (VT, USA, *Startle* Stimulus Package PHM-255A, ANL-925C Amplifier) erhoben (**Abb. 28a-b**). Die Apparatur beinhaltete vier identische schallgedämpfte Boxen (64 x 40 x 42 cm). Die Haltevorrichtung für die Tiere bestand aus einem transparenten Plastikzylinder (Länge 12.5 cm, Innendurchmesser 4.3 cm, 0.5 cm Wanddicke), dessen eine Längsseite 17 Löcher (0.3 cm Durchmesser, 1 cm Abstand zwischen den Löchern), angebracht in drei Reihen, enthielt. Jeder Plastikzylinder wurde in der Mitte einer Plastik Plattform fixiert (25 cm x 9 cm x 0,3 cm). Pro Box wurde je ein Plastikzylinder einer Kraftmessplattform obenauf gesetzt, dabei waren die Löcher des Plastikzylinders den zwei Lautsprechern der Stimuluskonsole zugewandt (in 7.5 cm Entfernung von der Mitte der Haltevorrichtung). Ein Lautsprecher lieferte das Hintergrundrauschen und der Hochtonlautsprecher die Stimuli. Die Bewegungen des Plastikzylinders wurden von einem piezoelektrischen Element, das sich unter jedem Zylinder in der Box befand, detektiert und gemessen. Der Schreckreflex wurde von der Kraftmessplattform übertragen, amplifiziert und über einen Bereich von 4096 Einheiten digitalisiert. Die Protokolle für ASR und FPS wurden mit Hilfe der "*Startle Reflex*" bzw. der "*Advanced Startle*" Software geschrieben. Für FPS wurden die elektrischen Impulse von in die Haltevorrichtung einsetzbaren Metallgittern geliefert (Stand Alone Shockers, ENV-414s-SR) und die Schockintensität mit Hilfe der PHM-265 Testeinheit (Shock Current Test Package) kalibriert.

#### *5.2.6.1 Fear Potentiated Startle*

Um Lernen und Gedächtnis zu untersuchen wurde die Pavlov'sche Furcht Konditionierung benutzt. In der Pavlov'sche Furcht Konditionierung wird ein neutral Stimulus wie z.B. ein Ton mit einem aversiven Stimulus wie z.B. einem elektrischen Schock (unkonditionierter Stimulus) gepaart. Nach einigen dieser Paarungen wird der Ton zu einem konditionierten Stimulus (CS), der die gleiche Reaktion wie der unkonditionierte Stimulus hervorruft, was

einer erfolgreichen Konditionierung oder gelernter Furcht entspricht (**Abb. 28c**). Im FPS Paradigma wird konditionierte Furcht als Erhöhung des Schreckreflexes auf den CS nach der Konditionierung im Vergleich zum Schreckreflex auf den CS vor der Konditionierung definiert.

Die FPS Versuche wurden zwischen 8:30h und 14:00h durchgeführt. Das FPS Protokoll bestand aus drei Sitzungen: Prä-Konditionierung, Konditionierung and Post- Konditionierung mit einer Pause von 24 h zwischen den einzelnen Teilen. Das in dieser Studie verwendete Protokoll basiert auf dem von Falls (Falls 2002). Ein Schocker wurde außerhalb jeder schallgedämpften Box platziert und die Metallgitter, die die elektrischen Impulse lieferten, waren während jeder Sitzung im Plastikzylinder vorhanden. FPS wurde ohne Hintergrundrauschen gemessen und als *Startle* Stimuli diente weißes Rauschen (Stimulus Dauer: 20 msec). Die Prä-Konditionierung begann mit einer Akklimatisationsphase von 5 min gefolgt von neun *Startle* Stimuli Trials (startle pulse alone) (Stimulus Intensitäten von 95, 100 und 105 dB; jede Intensität dreimal in zufälliger Reihenfolge präsentiert), die von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Nach diesen neun Anfangsstimuli wurde die Grundaktivität des Tieres gemessen, indem ihre Bewegungen in drei Trials ohne Stimulus (NS = no Stimulus) aufgezeichnet wurden. Insgesamt wurden sechs unterschiedliche Trialtypen je 3-mal in zufälliger Reihenfolge und einer Pause von 60 sec zwischen den Trials (inter trial interval = ITI) präsentiert: drei unterschiedliche CS Trials, in welchen der CS (12 kHz Ton, 60 dB, 30 sec lang) ohne Verzögerung den *Startle* Stimuli von 95, 100 oder 105 dB vorausging, und drei unterschiedlichen nur *Startle* Stimuli Trials (STL) von 95, 100 oder 105 dB Lautstärke. Sofort nach der Sitzung wurden die Mäuse aus dem Plastikzylinder genommen und in ihren Käfig gesetzt. Der Plastikzylinder wurde mit Wasser gespült und mit Pursept desinfiziert.

Der Stärke der Schreckreflex (ASR) entsprach die maximale Peak-to-Peak Amplitude, die innerhalb eines Zeitfensters von 100 msec nach dem Einsetzen des *Startle* Stimulus auftrat. Die durchschnittlichen Schreckreflexe wurden über alle drei *Startle* Stimulus Intensitäten bestimmt. Die unkonditionierte Antwort auf den CS wurde folgendermaßen berechnet:  
% Antwort auf den CS =  $[(CS - STL)/STL]*100$ .

Das Protokoll für die Konditionierung bestand aus fünf Trials, die nach einer 5 minütigen Akklimatisationsphase präsentiert wurden. Bei jedem Trial endete ein 30 sec langer, 12 kHz und 60 dB lauter Ton mit dem Einsetzen eines 0.5 sec langen Fußschocks der Stärke 0.4 mA. Die Pausen zwischen den Trials (ITI) betragen 180-330 sec.



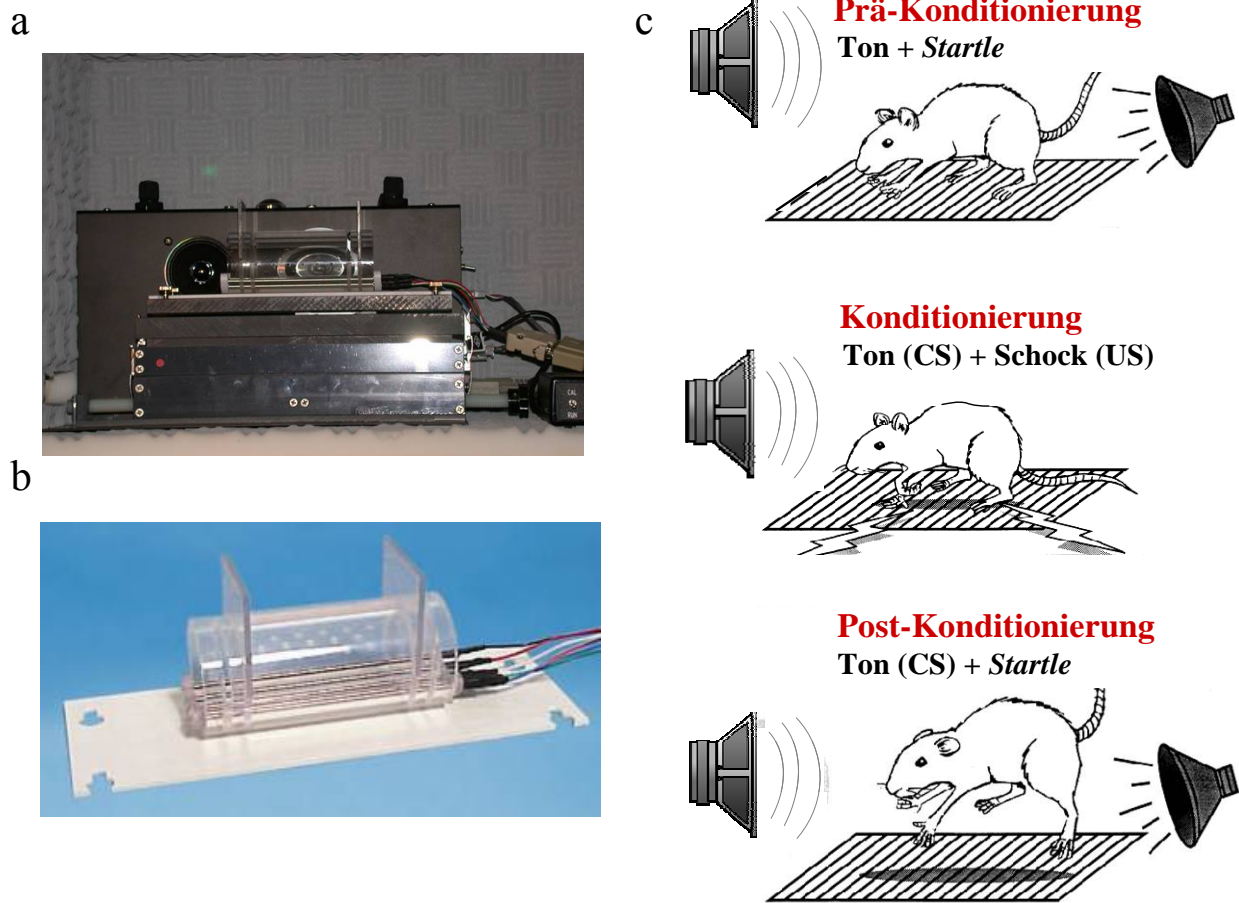
Das Protokoll und die Datenberechnung für die Post-Konditionierung waren exakt die gleichen wie für die Prä-Konditionierung. Die konditionierte Furcht (*Fear Potentiation*) wurde definiert als ein signifikanter Anstieg in der % Antwort auf den CS während der Post-Konditionierung versus Prä-Konditionierung.

### 5.2.6.2 Acoustic Startle Reflex

ASR Versuche wurden zwischen 08:30h and 17:00h durchgeführt. Die ASR Sitzung fand unter ständigem Hintergrundrauschen von 65 dB statt und als *Startle* Stimuli dienten Impulse weißen Rauschens (Stimulus Dauer: 40 msec). Jede Sitzung wurde von einer 5 minütigen Akklimatisationsphase eingeleitet, gefolgt von fünf *Startle* Stimuli (110 dB), die von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden.

Die Trialtypen umfassten 7 unterschiedliche Starte Stimulus Intensitäten (70, 80, 85, 90, 100, 110, 120 dB) und einen NS Trial, in welchem nur das Hintergrundrauschen präsentiert wurde, um die Grundaktivität des Tieres zu bestimmen. Jeder Trialtyp wurde 10-mal präsentiert. Dabei wurden die Trials in 10 Blöcke unterteilt und jeder Trialtyp trat einmal pro Block in zufälliger Reihenfolge auf. Die ITIs variierten zwischen 20 bis 30 sec. Schreckreflexe wurden als die erste Peak-to-Peak Amplitude mit einer Mindestgröße von 50 willkürlichen Einheiten, Schwingungsbeginn von mindestens 20 ms und Mindestdauer von 30 msec nach Einsetzen des *Startle* Stimulus definiert.

Dieses Protokoll basiert auf dem EMPReSS Protokoll für ASR und PPI (siehe <http://www.eumorphia.org>), das entsprechend den Anforderungen unserer *Startle* Apparatur (Med Associates, VT, USA) angepasst wurde.



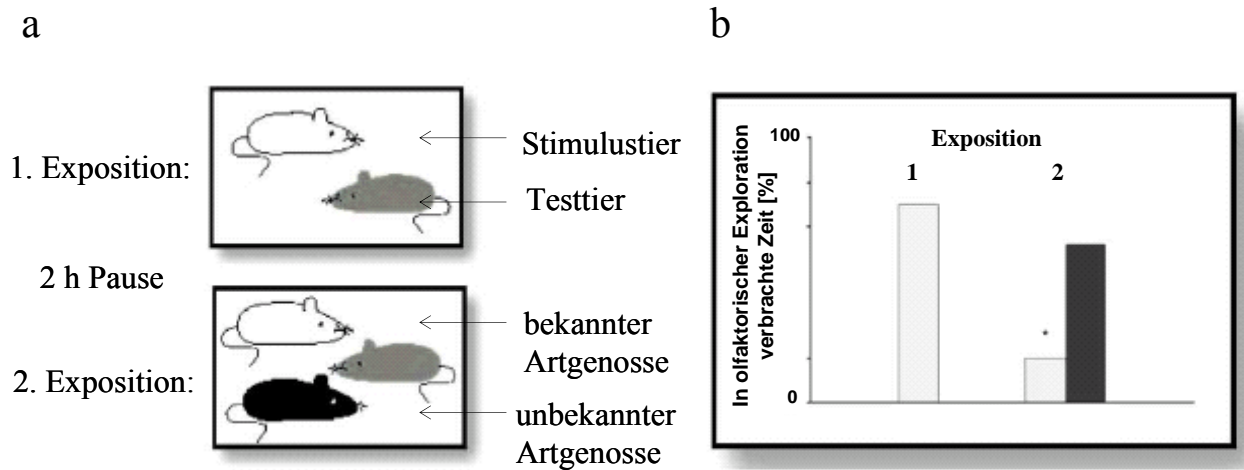
**Abbildung 28: Acoustic Startle Response und Fear Potentiated Startle:** (a) Startle Apparatur von Med Associates Inc. mit Plastikzylinder auf der Kraftmessplattform und zwei Lautsprechern in der Stimuluskonsole, (b) Haltevorrichtung für die Mäuse, hier mit einsetzbarem Schockgitter für Fear Potentiated Startle (FPS) Experimente und (c) das FPS Paradigma, in welchem während der Konditionierung gelernte Furcht als Erhöhung des Schreckreflexes auf den konditionierten Stimulus (CS) während der Post-Konditionierung im Vergleich zum Schreckreflex auf den CS vor der Konditionierung = Prä-Konditionierung gemessen wird.

### 5.2.7 Social Discrimination

Der *Social Discrimination* Test (**Abb. 29**) gehört zur Gruppe der Lern- und Gedächtnistests. Es wird die Fähigkeit gemessen, bekannte Artgenossen von unbekanntem Artgenossen zu unterscheiden (Bielsky and Young 2004). Im Grunde wird das „soziale Gedächtnis“ abgefragt. Genutzt wird im *Social Discrimination* Test die natürliche Tendenz der Maus, einen neuen Artgenossen olfaktorisch zu explorieren. Als olfaktorische Exploration wird das Verfolgen des Artgenossen in engem Abstand sowie Schnüffeln am Anogenitalbereich und Kopf definiert. Der hier durchgeführte Test basiert auf dem von Engelmann et al.

entwickelten *Social Discrimination* Test in Ratten (Engelmann et al. 1995) und in Mäusen verwendeten (Richter et al. 2005).

Für den Test wurde die Maus 2 Stunden vor der ersten Exposition einzeln in einen sauberen Käfig mit Streu, aber ohne Futter und Wasser, in das IVC-Rack gesetzt. Für den Test wurde der Käfig ohne Deckel auf eine graue Box im Tierhaltungsraum platziert und mit 200 Lux ausgeleuchtet. Für die erste Exposition wurde der Testmaus ein unbekannter Artgenossen (= Stimulustier) in den Käfig gesetzt und die Testmaus durfte das Stimulustier 4 Minuten lang frei explorieren. Danach wurde das Stimulustier wieder aus dem Käfig entfernt und dieser in das IVC-Rack gestellt. Nach einer Zeitspanne von 2 Stunden begann die zweite Exposition. Hierfür wurden der Testmaus wieder das Stimulustier (= bekannter Artgenosse) und gleichzeitig ein neuer unbekannter Artgenosse 4 Minuten lang präsentiert. Normalerweise sollte das Testtier deutlich mehr Zeit mit der Exploration des neuen unbekanntes Artgenossen als mit der des bekannten verbringen (Engelmann et al. 1995). Nach Ende der zweiten Exploration kam die Testmaus zurück in ihren Heimkäfig. Als Artgenossen dienten adulte ovariectomierte 129S1/SvImJ Weibchen, die als „bekannte“ bzw. „unbekannte Artgenossen“ getrennt in zwei Käfigen saßen (vier pro Käfig). Um die Weibchen auseinander halten zu können, wurden sie pro Käfig mit den Strichen I-IV am Schwanz markiert, dabei unterschieden sich die Lackstifte je Käfig farblich voneinander. Während des Tests saß ein trainierter Beobachter neben dem Käfig und hielt das Verhalten des Testtieres mit Hilfe eines tragbaren Computers fest. Aufgezeichnet wurden die Annäherungen an den später bekannten Artgenossen (= Stimulustier) während der ersten Exposition und die Annäherungen an den bekannten bzw. unbekanntes Artgenossen während der zweiten Exposition. Die vom Beobachter aufgenommenen Daten wurden mit Hilfe der Observer Software 4.1 (Noldus, Wageningen, NL) pro Exposition im Hinblick auf Häufigkeit, Latenz bis zum ersten Auftreten und Dauer in Bezug zur Gesamtbeobachtungszeit ausgewertet.



**Abbildung 29: Der Social Discrimination Test** (Abbildung adaptiert aus Bielsky et al., 2004); Zweite Exposition (2): Untersucht wird das Explorationsverhalten des Testtieres gegenüber dem unbekanntem Artgenossen im Vergleich zum Explorationsverhalten gegenüber dem - aus der ersten Exposition (1) - bekannten Artgenossen von vor zwei Stunden (a). Normalerweise verbringt das Testtier deutlich mehr Zeit mit der Exploration des unbekanntem Artgenossen als mit der des bekannten; die Daten sind idealisiert dargestellt (b).

### 5.2.8 Social Interaction

Der *Social Interaction* Test gehört zur Gruppe der Angsttests bei der die soziale Interaktion mit einem Artgenossen mit der Emotionalität der Tiere korreliert wird (Cappell and Latane 1969; File and Hyde 1978; Rex et al. 2004; Tonissaar et al. 2004). In diesem Test werden zwei Artgenossen in die gleiche Umgebung gesetzt und ihre soziale Interaktion beobachtet. In dieser Arbeit wurden die Mäuse einzeln an den zwei Tagen vor dem Test an die Testarena (Typ II Macrolon® Käfige, ohne Deckel und Streu) gewöhnt. Hierfür kam jede Maus für 10 Minuten in die Testarena, die wiederum in die Mitte der *Open Field* Box (48,5 x 48,5 x 38 cm, vgl. 2.2.4) bei einer Beleuchtung von 40 Lux platziert war. Für den Test wurden die Mäuse nach gleichem Genotyp und ähnlichem Gewicht in Zweiergruppen eingeteilt, die Testarena auf eine graue Box im Tierhaltungsraum gestellt und mit 40 Lux beleuchtet. Die zu einer Zweiergruppe gehörenden Mäuse wurden gleichzeitig in die Testarena gesetzt und durften für 10 Minuten frei explorieren. Das Verhalten der Mäuse wurde mit einem tragbaren Computer von einem neben der Testarena sitzenden trainierten Beobachter aufgenommen. Aufgezeichnet wurden soziale Interaktionen zwischen den Mäusen, unterteilt in aktive, passive und keine Interaktionen. Als aktive Interaktionen galten Riechen an Kopf, Körper, Genitalien oder Schwanz des Artgenossen Verfolgen des Artgenossen im engen Abstand und Putzen des Artgenossen; als passive Interaktion galt das Seite an Seite Sitzen mit Körperkontakt, und als keine Interaktion kein Interesse für den Artgenossen. Dabei wurde

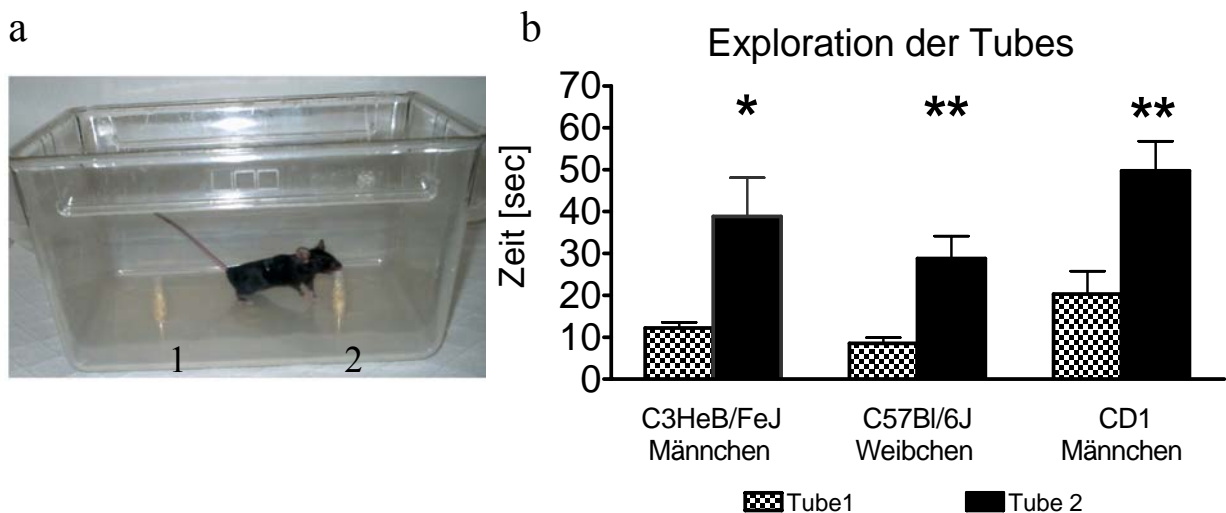
nicht unterschieden von welchem der beiden Testtiere die drei Interaktionsmöglichkeiten initiiert wurden. Die vom Beobachter aufgenommenen Daten wurden mit Hilfe der Observer Software 4.1 (Noldus, Wageningen, NL) im Hinblick auf Häufigkeit, Latenz bis zum ersten Auftreten und Dauer in Bezug zur Gesamtbeobachtungszeit ausgewertet.

### 5.2.9 Test für die Wahrnehmung des Geruchs eines Artgenossen

Dieser Test wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt, um festzustellen, ob die Testmäuse Duftstoffe eines Artgenossen ohne dessen physische Anwesenheit in der Testarena wahrnehmen können. Erkenntnisse aus der Geruchsdiskriminierung (**Abb. 30**) sollten die Interpretation der im *Social Discrimination* und *Social Interaction* Test gewonnenen Daten hinsichtlich der Frage, ob die olfaktorische Wahrnehmung des Artgenossen intakt war, unterstützen. Der Test für die Wahrnehmung des Geruchs eines Artgenossen wurde anhand von geschlechtsreifen Mäusen dreier Stämme (C3HeB/FeJ, C57BL/6J und CD1, **Abb. 30b**) validiert.

An den zwei Tagen vor dem Versuch wurden die Mäuse einzeln für jeweils 10 min bei 200 Lux an die saubere Testarena (Typ II Macrolon<sup>®</sup> Käfige, ohne Deckel und Streu) gewöhnt. Die Testarena wurde auf einen Metallwagen, dessen Längsseite an die Wand des Testraums gelehnt war, gestellt. Die für den Test verwendete Arena hatte zusätzlich zwei Löcher (Durchmesser 1.2 cm, jeweils 3,5 cm zur Wandbreite und 7,5 cm zur Wandlänge, 11 cm zwischen den Löchern) in den Boden gefräst. In diese Löcher wurde für den Test jeweils ein Tube (Eppendorfreaktionsgefäß 3810X, 1.5 ml) gesteckt. Dabei enthielt ein Tube frische Einstreu (= neutral), und das andere Einstreu aus einem Käfig geschlechtsreifer, dem Testtier unbekannter C57BL/6J Mäuse gleichen Geschlechts wie das Testtier (= markiert) (**Abb. 30a**). Die jeweilige Streu wurde direkt vor Testbeginn mit Hilfe einer sauberen Pinzette in die Tubes gefüllt, zuerst die neutrale, dann die markierte Streu, und die Tubes nach „Geruch“ getrennt voneinander aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Test wurden die Spitzen der für diesen Durchgang benötigten Tubes sauber gekappt, zuerst die des neutralen, dann die des markierten. Diese Reihenfolge sollte verhindern, dass das neutrale Tube mit den Gerüchen des markierten in Berührung kommt. Nachdem die Tubes im Käfig befestigt waren, wurde das Testtier in die vorbereitete Testarena gesetzt und durfte die Tubes 10 Minuten lang frei explorieren. Das Verhalten der Testmaus wurde mit einem tragbaren Computer von einem neben der Testarena sitzenden trainierten Beobachter aufgenommen. Aufgezeichnet wurde das Riechen am neutralen bzw. markierten Tube. Dabei wurde das Riechen als Bewegungen der

Schnauze an (nicht tiefer als ca. 0,5 cm unterhalb der Spitze) und über die offene Spitze des neutralen bzw. des markierten Tubes, sowie das Knabbern an der jeweiligen Spitze, definiert. Während des Tests unterschied der Beobachter zwischen rechts und links, nicht zwischen neutral und markiert. Nach dem Test wurde das Testtier in einen frischen Käfig gesetzt, um nicht in Berührung mit noch nicht getesteten Käfigmitgliedern zu kommen. Die benutzten Tubes wurden entsorgt, der Käfig gründlich desinfiziert und im trockenen Zustand für den nächsten Durchgang wie beschrieben mit frischen Tubes bestückt. Pro Durchgang wechselte die Position der jeweiligen Tubes, um einer möglichen Seitenpräferenz der Tiere vorzubeugen. Die vom Beobachter aufgenommenen Daten wurden mit Hilfe der Observer Software 4.1 (Noldus, Wageningen, NL) im Hinblick auf Häufigkeit, Latenz bis zum ersten Auftreten und Dauer in Bezug zur Gesamtbeobachtungszeit sortiert nach neutralem und markiertem Tube ausgewertet.



**Abbildung 30: Test für die Wahrnehmung eines Artgenossen:** Untersucht wird, ob die Testmaus Duftstoffe eines Artgenossen ohne dessen physische Anwesenheit in der Testarena wahrnehmen kann. Dabei enthält das eine Tube (a) frische Einstreu (1) und das andere Einstreu aus einem Käfig von gleichgeschlechtlichen, aber unbekanntem Artgenossen vom C57BL/6J Stamm (2). Ist die Maus fähig, den Duft von Artgenossen wahrzunehmen, sollte sie normalerweise mehr Zeit mit der olfaktorischen Exploration an Tube 2 im Vergleich zu Tube 1 verbringen (b): positive Geruchsdiskrimination bei C3H Männchen (n = 8, 9-14 Wochen), B6J Weibchen (n = 10; 9-11 Wochen) und CD1 Männchen (n = 7; 16 Wochen). Die Daten sind als Mittelwerte + S.E.M. dargestellt. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  Tube 1 vs. Tube 2 aus *two-tailed t-test für gepaarte Stichproben*.

## 5.3 Versuchsdurchführung

### 5.3.1 Teil 1: Validierung des modified Hole Boards

#### 5.3.1.1 Direkter Vergleich von Open Field zu mHB

Die *Open Field* Tests wurden mit 9 Wochen alten C3H und B6J Männchen und Weibchen (n = 10 pro Stamm und Geschlecht) durchgeführt. Die Stämme wurden im Abstand von 3 Wochen getestet und pro Stamm am gleichen Tag zuerst die Männchen, dann die Weibchen. Die Tests fanden jeweils von 8 - 13 Uhr statt.

#### 5.3.1.2 Einfluss des Boards in der mHB-Arena auf angstkorreliertes Verhalten

Der modified Hole Board Tests ohne *Board* im Zentrum der Arena wurde mit 9 Wochen alten C3H und B6J Männchen und Weibchen (n = 10 pro Stamm und Geschlecht) durchgeführt. Die Stämme wurden im Abstand von einer Woche getestet und pro Stamm am gleichen Tag zuerst die Männchen, dann die Weibchen. Die Tests fanden jeweils von 8 - 13 Uhr statt. Der Testaufbau und Verlauf entsprach im Wesentlichen dem für das mHB mit Gruppentestung (s. 5.2.2). Abweichend davon wurde das *Board* entfernt und das dadurch freie Zentrum entsprechend dem Außenbereich durch weiße Linien in zusätzlich drei gleichgroße Quadrate (20 x 16 cm) unterteilt. Das Zentrum wurde mit Hilfe von Ethovision 2.3 virtuell entsprechend der Lage und Größe des *Boards* definiert. Ethovision 2.3 zeichnete neben der gelaufenen Strecke und Geschwindigkeit ebenfalls die Eintritte ins Zentrum, Latenz bis zum ersten Eintritt ins Zentrum und die Gesamtaufenthaltsdauer im Zentrum auf.

Für die unter 5.3.1.1 und 5.3.1.2 verwendeten modified Hole Board Vergleiche in ihrer Ursprungsversion („mHB mit *Board*“) wurden C3H und B6J Mäuse beider Geschlechter (n = 10 pro Stamm und Geschlecht) aus Teil 2 (IVC classic, Gruppe, s. 5.3.2.2) als Vergleichsgruppen verwendet. Für diese Auswertung wurden die Ethovision-Daten des Lokomotions- als auch des angstkorrelierten Verhaltens verwendet.

#### 5.3.1.3 Einfluss der Blindheit bei C3H Mäusen auf das Verhalten im mHB

Im mHB wurden 29 blinde C3H/HeH und 29 sehende C3H.Pde6b+ Mäuse getestet. Dabei wurden 14 C3H/HeH und 15 C3H.Pde6b+ Weibchen bzw. 15 C3H/HeH und 14 C3H.Pde6b+ Männchen getestet. Der mHB Test wurde im Alter von 9-10 Wochen getrennt nach Geschlecht durchgeführt. Dabei wurden zuerst die Männchen und eine Woche später die Weibchen getestet verteilt auf jeweils zwei Tage.

### **5.3.2 Teil 2: Einfluss von IVC-Käfighaltung**

#### *5.3.2.1 Untersuchungen an einzelgehaltenen Männchen*

##### ***Haltungsbedingungen***

Für diese Untersuchungen wurde ein Teil der in IVCs geborenen C3H und B6J Mäuse im Alter von 6 bis 8 Tagen mit den Muttertieren in unterschiedlich gestaltete Käfige umgesiedelt (**Abb. 5** der Einleitung). Nach dem Absetzen wurden je 30 männliche Mäuse beider Stämme einzeln in drei unterschiedlichen Käfigtypen (n = 10), die in Abbildung 5 zu sehen sind, gehalten: a) in konventionellen Typ II Macrolon<sup>®</sup> Käfigen mit Deckeln aus Metallgitterstäben (Conventional) und in IVCs gleicher Größe b) mit massiven rostfreien Metalldeckeln wie vom Hersteller geliefert, aber mit zusätzlichen Metallgitterstäben („grid“), die an der Innenseite der Käfigdeckel befestigt wurden (IVC grid) oder c) in den ursprünglichen IVCs (IVC classic).

##### ***Versuchsaufbau***

Die einzelgehaltenen männlichen C3H und B6J Mäuse wurden bis zu einem Alter von 20 Wochen untersucht. Im Alter von 9 Wochen wurden sie in zufälliger Reihenfolge zuerst von im modified Hole Board (mHB) getestet. Im Ergebnisteil werden nur die Parameter gezeigt, die von Haltungsbedingungen beeinflusst waren, d.h. Lokomotions-, Angst-, Explorations- und Erregungsparameter. Zwei bis drei Tage nach dem mHB wurde der akustische Schreckreflex (*Acoustic Startle Response* = ASR) gemessen. Aufgrund technischer Probleme mit dem Datencomputer konnten die Daten nicht eingesehen und analysiert werden und mussten somit verworfen werden. Im Alter von 10 Wochen wurde die Verstärkung des Schreckreflexes durch konditionierte Furcht (*Fear Potentiated Startle*, FPS) erfasst. Im Alter von 14 Wochen wurde noch einmal der Schreckreflex untersucht. Um einen möglichen Einfluss eines altersbedingten Gehörverlustes (Henry and Chole 1980; Zheng et al. 1999) auf den ASR zu ermitteln, wurden die Mäuse im Alter von 20 Wochen wieder auf den ASR getestet. Alle Versuche wurden während der Lichtphase des Licht/Dunkel-Zyklus ausgeführt.

#### *5.3.2.2 Untersuchungen an gruppengehaltenen Mäusen beider Geschlechter*

##### ***Haltungsbedingungen***

Wie in 5.3.2.1 wurde für diese Untersuchungen ein Teil der in IVCs geborenen C3H und B6J Mäuse im Alter von 6 bis 8 Tagen mit den Muttertieren in unterschiedlich gestaltete Käfige



umgesiedelt (**Abb. 5** der Einleitung). Nach dem Absetzen wurden je 20 männliche und je 20 weibliche Mäuse beider Stämme nach Stamm und Geschlecht getrennt in Gruppen (n = 5) in zwei unterschiedlichen Käfigtypen (n = 10) gehalten: Einerseits in konventionellen Typ II Macrolon<sup>®</sup> Käfigen mit Deckeln aus Metallgitterstäben (Conventional) (**Abb. 5a** der Einleitung) und andererseits in IVCs gleicher Größe mit massiven rostfreien Metalldeckeln wie vom Hersteller geliefert (IVC classic) (**Abb. 5c** der Einleitung). Auf die Verwendung von IVC grid Käfigen (**Abb. 5b** der Einleitung) musste aufgrund des Platzangebotes zugunsten der Untersuchung von Weibchen verzichtet werden.

### ***Versuchsaufbau***

Die in Gruppenhaltung sitzenden männlichen und weiblichen C3H und B6J Mäuse wurden im Alter von 9 Wochen zuerst im modified Hole Board (mHB) getestet. Dabei wurden die Männchen zwei Tage nach den Weibchen getestet. Die mHB Ergebnisse der IVC classic Gruppen wurden über dieses Design hinaus als Vergleichsgruppen in Versuchen aus Teil 1 verwendet (siehe 5.3.1.1 und 5.3.1.2).

### **5.3.3 Teil 3: Nützlichkeit des mHB als Primärscreen in der German Mouse Clinic**

#### *5.3.3.1 Vergleich mit bereits publizierten Phänotypen – der PWD/PH Stamm und. die CRHR1 knockout Mauslinie*

##### ***PWD Mäuse im Vergleich zu C57BL/6J im mHB***

Für diese Analyse standen 30 PWD/Ph (PWD) (16 Männchen und 14 Weibchen) und 29 C57BL/6J Mäuse als Bezugsstamm (15 Männchen, 14 Weibchen) zur Verfügung. Die PWD Mäuse wurden im Alter von 8-9 Wochen in 2 Sätzen mit einem Zeitunterschied von drei Wochen im mHB getestet. Die B6J Kontrollen wurden eine Woche nach dem zweiten PWD Satz getestet.

##### ***CRHR1 knockout Mäuse im mHB***

Für diese Analyse standen 30 Weibchen (15 +/+ Kontrollen, 15 -/- Mutanten) und 30 Männchen (15 +/+ Kontrollen, 15 -/- Mutanten) zur Verfügung. Da bereits gezeigt worden ist, dass CRHR1 ko Mäuse eine Reduktion im angstkorrelierten Verhalten in der *Light Dark Box* zeigen (Timpl et al. 1998), wurden sie hier im Alter von 12-19 Wochen zuerst in der *Light Dark Box* getestet, um den beschriebenen Phänotyp zu reproduzieren, und erst eine

Woche später folgte der mHB-Test. Die Mäuse wurden nach Geschlecht getrennt mit 3-5 Tagen Unterschied getestet. Da die Männchen einzeln gehalten wurden, wurden alle mHB Experimente ohne das Gruppenkompartiment durchgeführt. Im Gegensatz zu den Weibchen waren die Männchen experimentell nicht naiv, da die Männchen am MPI vor der Lieferung an die GMC im *Forced Swim* Test untersucht worden waren.

### 5.3.3.2 Effizienz im Primärscreen – mutante Mauslinien innerhalb des GMC-Workflows

Die 62 mHB-Analysen verschiedener Mauslinien wurden nach folgenden Kriterien quantifiziert:

- 1) Anzahl der analysierten Mauslinien sowie darauf bezogen %-Anteil der Stammcharakterisierungen und %-Anteil der mutanten Mauslinien unterschieden nach den unterschiedlichen Mutations-Techniken
- 2) %-Anteil der Mauslinien mit signifikanten Änderungen der mHB-Parameter

Auf 2) bezogen:

- 3) %-Anteil der Mauslinien mit subtilen Änderungen der mHB-Parameter unbekannter Relevanz
- 4) %-Anteil der Mauslinien mit neuen Verhaltensphänotypen

Auf 3) bezogen:

- 5) %-Anteil der Mauslinien mit geschlechtsunabhängigem Verhaltensphänotypen
- 6) %-Anteil der Mauslinien mit einem Verhaltensphänotypen nur in Männchen
- 7) %-Anteil der Mauslinien mit einem Verhaltensphänotypen nur in Weibchen
- 8) %-Anteil der interessanten Mauslinien für sekundäre/tertiäre Verhaltensuntersuchungen

Darüber hinaus wurden die Mauslinien qualitativ in hauptsächliche *Phänotypenklassen* eingeordnet:

- 1) Vorwärtslokomotion: vorwiegend Änderungen in der gelaufenen Distanz, Linienübertritten und den Geschwindigkeiten
- 2) vertikale Exploration: vorwiegend Änderungen in der *Rearing*-Aktivität
- 3) Aktivitätslevel: Fast alle mHB-Parameter weisen signifikante Erniedrigungen oder Erhöhungen auf, keine spezifischen Änderungen nur einzelner Verhaltensdimensionen

- 4) Exploration: Kombination aus verändertem *Rearing*-Verhalten, Exploration des *Boards*, der Löcher und Objekte
- 5) Angst: vorwiegend Änderungen der *Board*-Parameter ohne Lokomotionsänderungen
- 6) Grooming: nur *Grooming*-Parameter sind verändert
- 7) Sozialverhalten: nur Änderungen in den Parametern für Sozialverhalten
- 8) Objekterkennung: nur Änderungen im Objekterkennungsindex

Die qualitativ eingeteilten *Phänotypklassen* wurden anschließend ebenfalls als Prozentsatz quantifiziert.

Auch wurde die prozentuale Verteilung der Mutations-Techniken in mutanten Mauslinien ohne primären Phänotyp (Mauslinien ohne Änderungen der mHB-Parameter plus Mauslinien mit subtilen Änderungen der mHB-Parameter unbekannter Relevanz) mit der prozentualen Verteilung im Gesamtpool der untersuchten Mutanten verglichen. Dabei wurde nach Mutanten, die mit der knockout Technologie (1), durch Gene-Trapping (2) oder durch ENU-Mutagenese (3) entstanden sind und dem Rest (4) (knock-in, consomics, transgene, usw.), unterschieden.

Die für Untersuchungen in *Teil 1* und *Teil 2* benutzen Inzuchtstämme C3HeB/FeJ und C57BL/6J waren in diesen Zusammenfassungen nicht enthalten.

### 5.3.3.3 Vom Primär- zum Sekundär-/Tertiärscreen: Verhaltensanalyse der Gene-Trap Mauslinie W04406 (*Neurochondrin*)

#### ***Modified Hole Board***

Die nachfolgenden Versuche dienen der Reproduktion des primären Angst- bzw. Sozialverhalten-Phänotyps bei *Neurochondrin* Mäusen im mHB (A) sowie der Untersuchung von Haltungsbedingungen auf diesen mHB – Phänotyp (A-C):

#### A) *Gruppenhaltung und mHB-Gruppentestung:*

Für die Reproduktion des mHB-Phänotyps und Analyse gruppengehaltener *Neurochondrin* Mäuse in der mHB-Gruppentestung standen 20 +/+ Kontrollen (10 Männchen, 10 Weibchen) und 19 -/- Mutanten (9 Männchen, 10 Weibchen) zur Verfügung. Sie wurden im Alter von 7-11 Wochen in die GMC importiert und in IVCs in Gruppen von 4-5 Mäusen pro Käfig,

getrennt nach Geschlecht aber nicht nach Genotyp, gehalten. Im Alter von 9-13 Wochen wurden sie im mHB mit Gruppenkompartiment getestet. Zuerst wurden die Weibchen, einen Tag später die Männchen getestet.

### *B) Einzelhaltung und mHB-Einzeltestung:*

Der mHB-Test mit Neurochondrin Mäusen in Einzelhaltung und damit ohne Gruppenkompartiment wurde mit 26 +/+ Kontrollen (13 Männchen, 13 Weibchen) und 25 -/- Mutanten (12 Männchen, 13 Weibchen) durchgeführt. Die Mäuse wurden im Alter von 8-15 Wochen in die GMC transportiert und dort in Einzelhaltung in IVCs gehalten. Drei Wochen später wurden sie im Alter von 11-18 Wochen im mHB ohne Gruppenkompartiment getestet. Zuerst wurden die Weibchen, am darauf folgenden Tag die Männchen getestet.

### *C) Gruppenhaltung und mHB-Einzeltestung:*

Für den Einfluss der mHB-Einzeltestung auf den Phänotyp von gruppengehaltenen Neurochondrin Mäusen wurden 33 +/+ Kontrollen (17 Männchen, 16 Weibchen) und 21 -/- Mutanten (8 Männchen, 13 Weibchen) im mHB ohne Gruppenkompartiment getestet. Die Mäuse wurden im Alter von 7-9 Wochen in die GMC transportiert und dort in Gruppenhaltung (n = 4-5), getrennt nach Geschlecht aber nicht nach Genotyp, in IVCs gehalten. Zwei Wochen später wurden sie im Alter von 9-12 Wochen im mHB ohne Gruppenkompartiment getestet. Zuerst wurden die Weibchen, am darauf folgenden Tag die Männchen getestet.

### *Elevated Plus Maze und Light Dark Box*

Der *Elevated Plus Maze* Test wurde drei und die *Light Dark Box* sieben Tage nach den mHB Tests durchgeführt. Analysiert wurden jeweils in Gruppen- (A) und Einzelhaltung gehaltene (B) Ncdn Mäuse. Für die Tests von gruppengehaltenen Ncdn Mäuse standen 19 +/+ Kontrollen (9 Männchen, 10 Weibchen) und 19 -/- Mutanten (9 Männchen, 10 Weibchen) zur Verfügung (Mäuse aus mHB (A)). Ein Kontrollmännchen wurde wegen einer Wunde aus dem Test genommen). Für die Tests einzelngelhaltener Ncdn Mäuse standen 15 +/+ Kontrollen (6 Männchen, 9 Weibchen) und 19 -/- Mutanten (10 Männchen, 9 Weibchen) zur Verfügung (Teil der Mäuse aus mHB (B)).

### ***Social Interaction***

Der *Social Interaction* Test wurde 3 Tage nach der *Light Dark Box* durchgeführt. Für *Social Interaction* einzelgehaltener (A) Ncdn Mäusen standen 52 +/+ Kontrollen (26 Männchen, 26 Weibchen) und 27 -/- Mutanten (14 Männchen, 24 Weibchen), für die Untersuchungen an gruppengehaltenen (B) Ncdn Mäusen 22 +/+ Kontrollen (14 Männchen, 8 Weibchen) und 24 -/- Mutanten (12 Männchen, 12 Weibchen) zur Verfügung. D.h. die Mäuse, die in der *Elevated Plus Maze* und in der *Light Dark Box* getestet worden waren, wurden mit zusätzlichen Mäusen aus den mHB Versuchen aufgefüllt. Die Paarungen für die *Social Interaction* Tests wurden pro Geschlecht nach Genotyp und Gewicht gematched.

### ***Social Discrimination***

Vier bis fünf Wochen nach *Social Interaction* wurden die *Social Discrimination* Tests durchgeführt. Bei gruppengehaltenen (A) Ncdn wurden 25 +/+ Kontrollen (12 Männchen, 13 Weibchen) und 24 -/- Mutanten (12 Männchen, 12 Weibchen), bei einzelgehaltenen (B) Ncdn 25 +/+ Kontrollen (12 Männchen, 13 Weibchen) und 25 -/- Mutanten (12 Männchen, 13 Weibchen) getestet.

### ***Test für die Wahrnehmung des Geruchs eines Artgenossen***

Für die Geruchsuntersuchungen wurden je 10 naive Ncdn pro Geschlecht und Genotyp (+/+; -/-) im Alter von 14-15 Wochen getestet. Diese waren in Gruppenhaltung in konventionellen Käfigen (vgl. **Abb. 5a** der Einleitung) gezüchtet und aufgezogen worden.

## **5.4 Statistik**

Die Daten wurden als Mittelwerte + S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt und mit Hilfe der SPSS Software (SPSS Inc, Chicago, USA) statistisch analysiert.

Die mHB-Daten wurden mit einer 3-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Faktor *Test*, Faktor *Stamm*, Faktor *Geschlecht*) bzw. 2-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Faktor *Test*, Faktor *Geschlecht* bzw. Faktor *Stamm*, Faktor *Haltung* bzw. Faktor *Stamm*, Faktor *Geschlecht* bzw. Faktor *Genotyp*, Faktor *Geschlecht*) mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  analysiert. Wenn angebracht, wurde für *post hoc* Mehrfachvergleiche der Bonferroni Test angewandt. Signifikante Unterschiede innerhalb eines/r Testes/Stammes/Haltungsbedingung/Genotyps wurden in Abbildungen dementsprechend gekennzeichnet. Für die 2-faktorielle ANOVA wurde im Falle einer nicht signifikanten Interaktion diese ohne

Interaktion wiederholt. Die resultierenden p-Werte für die Hauptfaktoren wurden als Endergebnisse hergenommen und im Text erwähnt.

Die FPS Daten wurden zuerst mit einer 3-faktoriellen ANOVA für wiederholte Messungen analysiert (unabhängige Faktoren *Stamm* und *Haltung*, abhängiger Faktor *Konditionierung*). Im Falle einer nicht-signifikanten Interaktion wurde der Effekt der Haltungsbedingungen auf die Konditionierung unabhängig für jeden Stamm mit einer 2-faktoriellen ANOVA (Faktoren: *Haltung*, *Konditionierung*) analysiert, die auch für den Vergleich der Prä-Konditionierung der zwei Stämme hergenommen wurde (Faktor *Stamm*, *Haltung*).

Der Schreckreflex jedes Stammes im Alter von 14 bzw. 20 Wochen wurde mit der Analyse für linear gemischte Modelle untersucht (feste Faktoren: *Haltung*, *dB* und die Interaktion *Haltung x dB*; Zufallsfaktor: *Mäuse*; abhängiger Faktor: *Schreckreflex*). Die Schwelle der Schreckreflexe wurde ebenfalls mit der Analyse für linear gemischte Modelle untersucht (fester Faktor: *dB*; Zufallsfaktor: *Mäuse*; abhängiger Faktor: *Schreckreflex*). Im Falle einer vorhergehend signifikanten *Haltung x dB* Interaktion wurde die Schreckreflex-Schwelle für jede Haltungsbedingung separat analysiert. Im Falle einer nicht signifikanten Interaktion wurde die Schreckreflex-Schwelle für jeden Stamm, indem die Daten der drei unterschiedlichen Haltungsbedingungen gepoolt wurden, bestimmt. Die Schwelle für den Schreckreflex wurde als die Stimulusintensität, ab welcher beständig ein signifikant erhöhter Schreckreflex ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zum basalen Schreckreflex bei 65 dB (Hintergrund) ausgelöst wurde, definiert. Um den Einfluss des Alters auf die Schreckreflexe pro Stamm zu bestimmen, wurden jeweils die Daten der Haltungsbedingungen von für 14 Wochen bzw. 20 Wochen gepoolt und mit der Analyse für linear gemischte Modelle miteinander verglichen (fester Faktor: *Alter*; Zufallsfaktor: *Mäuse*; abhängiger Faktor: *Schreckreflex*).

Die Light Dark Box Daten der CRHR1 ko Mäuse beider Geschlechter wurden zusammengefasst und mit dem einseitigen Student's *t*-Test für ungepaarte Stichproben ungleicher Varianzen mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  statistisch ausgewertet.

Die Elevated Plus Maze und die Light Dark Box Daten der Ncdn Mäuse wurden mit einer 2-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Faktor *Geschlecht* bzw. Faktor *Genotyp*) mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  analysiert. Da sich in keinem der untersuchten *Elevated Plus Maze*-Parameter und nur in einem der *Light Dark Box*-Parameter eine signifikante Interaktion ergab, wurden die Daten der Männchen und Weibchen entsprechend der Genotypen bei nicht signifikanter Interaktion in den Abbildungen gepoolt und die 2-faktorielle ANOVA wurde

ohne Interaktion wiederholt. Die resultierenden p-Werte für die Hauptfaktoren wurden als Endergebnisse hergenommen und im Text erwähnt.

Daten des Social Discrimination Tests sowie für den Test für die Wahrnehmung des Geruchs eines Artgenossen der Ncdn Mäuse beider Geschlechter wurden pro Geschlecht mit dem zweiseitigen Student's *t*-Test für gepaarte Stichproben mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  statistisch ausgewertet.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe K, Fuchs H, Lisse T, Hans W, Hrabe de Angelis M (2006) New ENU-induced semidominant mutation, *Ali18*, causes inflammatory arthritis, dermatitis, and osteoporosis in the mouse. *Mamm Genome* 17:915-26
- Allen E (1922) The oestrus cycle in the mouse. *Am J Anat* 30:297-371
- Ammassari-Teule M, Fagioli S, Rossi-Arnaud C (1994) Radial maze performance and open-field behaviours in aged C57BL/6 mice: further evidence for preserved cognitive abilities during senescence. *Physiol Behav* 55:341-5
- Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangoram AM, King DP, Pinto LH, Takahashi JS (1997) Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89:655-67
- Apostolova I, Irintchev A, Schachner M (2006) Tenascin-R restricts posttraumatic remodeling of motoneuron innervation and functional recovery after spinal cord injury in adult mice. *J Neurosci* 26:7849-59
- Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, Dove WF, et al. (2004) The knockout mouse project. *Nat Genet* 36:921-4
- Auwerx J, Avner P, Baldock R, Ballabio A, Balling R, Barbacid M, Berns A, et al. (2004) The European dimension for the mouse genome mutagenesis program. *Nat Genet* 36:925-7
- Avgustinovich DF, Gorbach OV, Kudryavtseva NN (1997) Comparative analysis of anxiety-like behavior in partition and plus-maze tests after agonistic interactions in mice. *Physiol Behav* 61:37-43
- Bailey KR, Rustay NR, Crawley JN (2006) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: practical concerns and potential pitfalls. *Ilar J* 47:124-31
- Balling R (2001) ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:463-92
- Banbury Conference (1997) Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Banbury Conference on genetic background in mice. Neuron* 19, 755-9
- Bardo MT, Klebaur JE, Valone JM, Deaton C (2001) Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology (Berl)* 155:278-84
- Becerra L, Breiter HC, Wise R, Gonzalez RG, Borsook D (2001) Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. *Neuron* 32:927-46
- Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF, Fisher EM (2000) Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 24:23-5
- Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 1:1306-11
- Bielsky IF, Young LJ (2004) Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides* 25:1565-74
- Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM (2004) Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. *Behav Brain Res* 155:197-206
- Blanchard RJ, Hebert MA, Ferrari PF, Palanza P, Figueira R, Blanchard DC, Parmigiani S (1998) Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiol Behav* 65:201-9
- Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC (2001) Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav* 73:261-71



- Blizard DA (1971) Situational determinants of Open-Field behaviour in *Mus musculus*. *Br. J. of Psychol.* 62:245-252
- Bolivar VJ, Caldarone BJ, Reilly AA, Flaherty L (2000) Habituation of activity in an open field: A survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav Genet* 30:285-93
- Bolivar VJ, Pooler O, Flaherty L (2001) Inbred strain variation in contextual and cued fear conditioning behavior. *Mamm Genome* 12:651-6
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256-9
- Bothe GW, Bolivar VJ, Vedder MJ, Geistfeld JG (2005) Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models. *Comp Med* 55:326-34
- Bourin M, Hascoet M (2003) The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463:55-65
- Bouwknicht JA, Paylor R (2002) Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine mouse strains. *Behav Brain Res* 136:489-501
- Branda CS, Dymecki SM (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6:7-28
- Brodkin ES, Hagemann A, Nemetski SM, Silver LM (2004) Social approach-avoidance behavior of inbred mouse strains towards DBA/2 mice. *Brain Res* 1002:151-7
- Brooks SP, Pask T, Jones L, Dunnett SB (2005) Behavioural profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. II: cognitive tests. *Genes Brain Behav* 4:307-17
- Brown RE, Wong AA (2007) The influence of visual ability on learning and memory performance in 13 strains of mice. *Learn Mem* 14:134-44
- Brown SD, Chambon P, de Angelis MH (2005) EMPReSS: standardized phenotype screens for functional annotation of the mouse genome. *Nat Genet* 37:1155
- Brown SD, Hancock JM, Gates H (2006) Understanding mammalian genetic systems: the challenge of phenotyping in the mouse. *PLoS Genet* 2:e118
- Brown SD, Hardisty RE (2003) Mutagenesis strategies for identifying novel loci associated with disease phenotypes. *Semin Cell Dev Biol* 14:19-24
- Bucan M, Abel T (2002) The mouse: genetics meets behaviour. *Nat Rev Genet* 3:114-23
- Cahill L (2006) Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 7:477-84
- Cappell H, Latane B (1969) Effects of alcohol and caffeine on the social and emotional behavior of the rat. *Q J Stud Alcohol* 30:345-56
- Cavusoglu N, Thierse D, Mohand-Said S, Chalmel F, Poch O, Van-Dorsselaer A, Sahel JA, Leveillard T (2003) Differential proteomic analysis of the mouse retina: the induction of crystallin proteins by retinal degeneration in the rd1 mouse. *Mol Cell Proteomics* 2:494-505
- Champy MF, Selloum M, Piard L, Zeitler V, Caradec C, Chambon P, Auwerx J (2004) Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mamm Genome* 15:768-83
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR (2002) Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 42:517-25
- Chapillon P, Manneche C, Belzung C, Caston J (1999) Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet* 29:41-6
- Chen L, Cagniard B, Mathews T, Jones S, Koh HC, Ding Y, Carvey PM, Ling Z, Kang UJ, Zhuang X (2005) Age-dependent motor deficits and dopaminergic dysfunction in DJ-1 null mice. *J Biol Chem* 280:21418-26
- Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS (2001) A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev* 25:235-60

- Clapcote SJ, Lazar NL, Bechard AR, Roder JC (2005) Effects of the rd1 mutation and host strain on hippocampal learning in mice. *Behav Genet* 35:591-601
- Clement Y, Proeschel MF, Bondoux D, Girard F, Launay JM, Chapouthier G (1997) Genetic factors regulate processes related to anxiety in mice. *Brain Res* 752:127-35
- Crabbe JC (1986) Genetic differences in locomotor activation in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 25:289-92
- Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC (1999) Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284:1670-2
- Crawley J (1999a) Evaluating anxiety in rodents. Vol 13
- Crawley J, Goodwin FK (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13:167-70
- Crawley JN (1981) Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 15:695-9
- Crawley JN (1999b) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* 835:18-26
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 132:107-24
- Crawley JN, Davis LG (1982) Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain Res Bull* 8:609-12
- Crawley JN, Paylor R (1997) A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav* 31:197-211
- Dateki M, Horii T, Kasuya Y, Mochizuki R, Nagao Y, Ishida J, Sugiyama F, Tanimoto K, Yagami K, Imai H, Fukamizu A (2005) Neurochondrin negatively regulates CaMKII phosphorylation, and nervous system-specific gene disruption results in epileptic seizure. *J Biol Chem* 280:20503-8
- Davis M (1980) Neurochemical modulation of sensory-motor reactivity: acoustic and tactile startle reflexes. *Neurosci Biobehav Rev* 4:241-63
- de Melo CT, Monteiro AP, Leite CP, de Araujo FL, Lima VT, Barbosa-Filho JM, de Franca Fonteles MM, de Vasconcelos SM, de Barros Viana GS, de Sousa FC (2006) Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Biol Pharm Bull* 29:451-4
- De Souza EB (1995) Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20:789-819
- DeFries JC, Gervais MC, Thomas EA (1978) Response to 30 generations of selection for open-field activity in laboratory mice. *Behav Genet* 8:3-13
- Deussing JM, Wurst W (2005) Dissecting the genetic effect of the CRH system on anxiety and stress-related behaviour. *C R Biol* 328:199-212
- Ducottet C, Belzung C (2005) Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. *Behav Brain Res* 156:153-62
- Dunham NW, Miya TS (1957) A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)* 46:208-9
- Dunn AJ, Guild AL, Kramarcy NR, Ware MD (1981) Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTH or beta-endorphin. *Pharmacol Biochem Behav* 15:605-8

- Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R (1995) Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* 58:315-21
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59
- Falls W (2002) Fear-potentiated startle in mice. *Current protocols in neuroscience Unit* 8.11B.1-8.11B.16
- Falls WA, Carlson S, Turner JG, Willott JF (1997) Fear-potentiated startle in two strains of inbred mice. *Behav Neurosci* 111:855-61
- Feldman DE, Brecht M (2005) Map plasticity in somatosensory cortex. *Science* 310:810-5
- Fentrop N WC (2000) Fiat lux! Spotting a common experimental problem. Poster presented at Measuring Behavior 2000 3rd International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research, 15-18 August 2000, Nijmegen, The Netherlands
- Fernandes C, File SE (1996) The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 54:31-40
- Fernandes C, Liu L, Paya-Cano JL, Gregorova S, Forejt J, Schalkwyk LC (2004) Behavioral characterization of wild derived male mice (*Mus musculus musculus*) of the PWD/Ph inbred strain: high exploration compared to C57BL/6J. *Behav Genet* 34:621-30
- Ferrari PF, Palanza P, Parmigiani S, Rodgers RJ (1998) Interindividual variability in Swiss male mice: relationship between social factors, aggression, and anxiety. *Physiol Behav* 63:821-7
- File SE, Hyde JR (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 62:19-24
- File SE, Wardill AG (1975a) The reliability of the hole-board apparatus. *Psychopharmacologia* 44:47-51
- File SE, Wardill AG (1975b) Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44:53-9
- Gailus-Durner V, Fuchs H, Becker L, Bolle I, Brielmeier M, Calzada-Wack J, Elvert R, et al. (2005) Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nat Methods* 2:403-4
- Goldstein JL (2001) Laskers for 2001: knockout mice and test-tube babies. *Nat Med* 7:1079-80
- Gottesman, II, Gould TD (2003) The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 160:636-45
- Gould TD, Gottesman, II (2006) Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes Brain Behav* 5:113-9
- Green TA, Gehrke BJ, Bardo MT (2002) Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed- and progressive-ratio schedules. *Psychopharmacology (Berl)* 162:373-8
- Gregorova S, Forejt J (2000) PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m. musculus* subspecies--a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biol (Praha)* 46:31-41
- Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ (2000) Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)* 148:164-70
- Hackam AS, Strom R, Liu D, Qian J, Wang C, Otteson D, Gunatilaka T, Farkas RH, Chowers I, Kageyama M, Leveillard T, Sahel JA, Campochiaro PA, Parmigiani G, Zack DJ (2004) Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2929-42
- Hagenbuch N, Feldon J, Yee BK (2006) Use of the elevated plus-maze test with opaque or transparent walls in the detection of mouse strain differences and the anxiolytic effects of diazepam. *Behav Pharmacol* 17:31-41

- Halcomb RA, Hegmann JP, DeFries JC (1975) Open-field behavior in mice: A diallel analysis of selected lines. *Behav Genet* 5:217-31
- Hall CS (1934) Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *The Journal of Comparative Psychology* 18:385-402
- Hall CS, Ballechey EL (1932) A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. *Psychology* 6:1-12
- Hamer D (2002) Genetics. Rethinking behavior genetics. *Science* 298:71-2
- Hankin BL, Mermelstein R, Roesch L (2007) Sex differences in adolescent depression: stress exposure and reactivity models. *Child Dev* 78:279-95
- Hansen J, Floss T, Van Sloun P, Fuchtbauer EM, Vauti F, Arnold HH, Schnutgen F, Wurst W, von Melchner H, Ruiz P (2003) A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9918-22
- Hart AW, McKie L, Morgan JE, Gautier P, West K, Jackson IJ, Cross SH (2005) Genotype-phenotype correlation of mouse *pde6b* mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:3443-50
- Heiser P, Friedel S, Dempfle A, Konrad K, Smidt J, Grabarkiewicz J, Herpertz-Dahlmann B, Remschmidt H, Hebebrand J (2004) Molecular genetic aspects of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 28:625-41
- Henniger MS, Ohl F, Holter SM, Weissenbacher P, Toschi N, Lorsch P, Wigger A, Spanagel R, Landgraf R (2000) Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 111:153-63
- Henry KR, Chole RA (1980) Genotypic differences in behavioral, physiological and anatomical expressions of age-related hearing loss in the laboratory mouse. *Audiology* 19:369-83
- Höller SM, Auwerx, J., Brown, S., Chambon, P., Coghill, E., Gale K, Golini, E., Jacquot, S., Krezel, W., Lad, H., Mandillo, S., Marazziti D, Meziane, H., Nolan, P., Ouagazzal, A., Pedersen, V., Rosenthal N, Tocchini-Valentini, G., Tucci, V. & Wurst, W. (2004) EUMORPHIA comprehensive first-line phenotyping protocol for mice: results from primary screen to evaluate behaviour and cognition. In FENS meeting, poster A042.12, Lisbon, Portugal.
- Hogg S (1996) A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54:21-30
- Hoglund AU, Renstrom A (2001) Evaluation of individually ventilated cage systems for laboratory rodents: cage environment and animal health aspects. *Lab Anim* 35:51-7
- Holmes A, Parmigiani S, Ferrari PF, Palanza P, Rodgers RJ (2000) Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety. *Physiol Behav* 71:509-16
- Holsboer F, Spengler D, Heuser I (1992) The role of corticotropin-releasing hormone in the pathogenesis of Cushing's disease, anorexia nervosa, alcoholism, affective disorders and dementia. *Prog Brain Res* 93:385-417
- Holter SM, Kallnik M, Wurst W, Marsicano G, Lutz B, Wotjak CT (2005) Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task. *Eur J Pharmacol* 510:69-74
- Hoover-Plow J, Skomorovska-Prokvolit O, Welsh S (2001) Selective behaviors altered in plasminogen-deficient mice are reconstituted with intracerebroventricular injection of plasminogen. *Brain Res* 898:256-64
- Hrabe de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, et al. (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet* 25:444-7

- Inoue K, Lupski JR (2003) Genetics and genomics of behavioral and psychiatric disorders. *Curr Opin Genet Dev* 13:303-9
- Ishizuka Y, Mochizuki R, Yanai K, Takatsuka M, Nonomura T, Niida S, Horiguchi H, Maeda N, Fukamizu A (1999) Induction of hydroxyapatite resorptive activity in bone marrow cell populations resistant to bafilomycin A1 by a factor with restricted expression to bone and brain, neurochondrin. *Biochim Biophys Acta* 1450:92-8
- Istvanffy R, Vogt Weisenhorn DM, Floss T, Wurst W (2004) Expression of neurochondrin in the developing and adult mouse brain. *Dev Genes Evol* 214:206-9
- Johnson KR, Erway LC, Cook SA, Willott JF, Zheng QY (1997) A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res* 114:83-92
- Kalueff AV, Tuohimaa P (2004) Contrasting grooming phenotypes in C57Bl/6 and 129S1/SvImJ mice. *Brain Res* 1028:75-82
- Kalueff AV, Tuohimaa P (2005) Contrasting grooming phenotypes in three mouse strains markedly different in anxiety and activity (129S1, BALB/c and NMRI). *Behav Brain Res* 160:1-10
- Keeney AJ, Hogg S (1999) Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. *Behav Pharmacol* 10:753-64
- Keverne EB, Curley JP (2004) Vasopressin, oxytocin and social behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 14:777-83
- Klempt M, Rathkolb B, Fuchs E, de Angelis MH, Wolf E, Aigner B (2006) Genotype-specific environmental impact on the variance of blood values in inbred and F1 hybrid mice. *Mamm Genome* 17:93-102
- Kopp C, Vogel E, Rettori MC, Delagrangé P, Guardiola-Lemaitre B, Misslin R (1998) Effects of a daylight cycle reversal on locomotor activity in several inbred strains of mice. *Physiol Behav* 63:577-85
- Kornstein SG, Schatzberg AF, Thase ME, Yonkers KA, McCullough JP, Keitner GI, Gelenberg AJ, Davis SM, Harrison WM, Keller MB (2000a) Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. *Am J Psychiatry* 157:1445-52
- Kornstein SG, Schatzberg AF, Thase ME, Yonkers KA, McCullough JP, Keitner GI, Gelenberg AJ, Ryan CE, Hess AL, Harrison W, Davis SM, Keller MB (2000b) Gender differences in chronic major and double depression. *J Affect Disord* 60:1-11
- Kraft V, Deeny A, Blanchet H, Boot R, Hansen A, Hem A, van Herck H, Kunstyr I, Milite G, Needham J, Nicklas W, Perrot A, Rehbindler C, Richard Y, De Vroey G (1994) Recommendations for health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies. *Laboratory Animals* 28: 1-12, 1994. *Laboratory Animals* 28:1-12
- Krohn TC, Hansen AK (2002) Carbon dioxide concentrations in unventilated IVC cages. *Lab Anim* 36:209-12
- Krsiak M, Janku I (1971) Measurement of pharmacological depression of exploratory activity in mice: a contribution to the problem of time-economy and sensitivity. *Psychopharmacologia* 21:118-30
- Kuhn R, Streif S, Wurst W (2007) RNA interference in mice. *Handb Exp Pharmacol* 178:149-76
- Kuriwaki J, Nishijo H, Kondoh T, Uwano T, Torii K, Katsuki M, Ono T (2004) Comparison of brain activity between dopamine D2 receptor-knockout and wild mice in response to dopamine agonist and antagonist assessed by fMRI. *Neurosignals* 13:227-40
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nussbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921
- Leboyer M, Bellivier F, Nosten-Bertrand M, Jouvent R, Pauls D, Mallet J (1998) Psychiatric genetics: search for phenotypes. *Trends Neurosci* 21:102-5

- Lewejohann L, Reinhard C, Schrewe A, Brandewiede J, Haemisch A, Gortz N, Schachner M, Sachser N (2006) Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes Brain Behav* 5:64-72
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92:180-5
- Lister RG (1990) Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 46:321-40
- Liu CH, Kim YR, Ren JQ, Eichler F, Rosen BR, Liu PK (2007) Imaging cerebral gene transcripts in live animals. *J Neurosci* 27:713-22
- Logue SF, Owen EH, Rasmussen DL, Wehner JM (1997) Assessment of locomotor activity, acoustic and tactile startle, and prepulse inhibition of startle in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80:1075-86
- McCarthy JJ (2007) Gene by sex interaction in the etiology of coronary heart disease and the preceding metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17:153-61
- McFadyen MP, Kusek G, Bolivar VJ, Flaherty L (2003) Differences among eight inbred strains of mice in motor ability and motor learning on a rotorod. *Genes Brain Behav* 2:214-9
- McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2001) The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol Behav* 73:705-17
- Metz GA, Schwab ME (2004) Behavioral characterization in a comprehensive mouse test battery reveals motor and sensory impairments in growth-associated protein-43 null mutant mice. *Neuroscience* 129:563-74
- Mikaelian DO (1979) Development and degeneration of hearing in the C57/b16 mouse: relation of electrophysiologic responses from the round window and cochlear nucleus to cochlear anatomy and behavioral responses. *Laryngoscope* 89:1-15
- Miyakawa T, Yared E, Pak JH, Huang FL, Huang KP, Crawley JN (2001) Neurogranin null mutant mice display performance deficits on spatial learning tasks with anxiety related components. *Hippocampus* 11:763-75
- Mochizuki R, Dateki M, Yanai K, Ishizuka Y, Amizuka N, Kawashima H, Koga Y, Ozawa H, Fukamizu A (2003) Targeted disruption of the neurochondrin/norbin gene results in embryonic lethality. *Biochem Biophys Res Commun* 310:1219-26
- Mogil JS, Richards SP, O'Toole LA, Helms ML, Mitchell SR, Kest B, Belknap JK (1997) Identification of a sex-specific quantitative trait locus mediating nonopioid stress-induced analgesia in female mice. *J Neurosci* 17:7995-8002
- Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Perez A, Holloway LP, Barbaro RP, Barbaro JR, Wilson LM, Threadgill DW, Lauder JM, Magnuson TR, Crawley JN (2007) Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res* 176:4-20
- Mrosovsky N (2003) Aschoff's rule in retinally degenerate mice. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 189:75-8
- Muroi Y, Ishii T, Komori S, Kitamura N, Nishimura M (2006) Volatile female odors activate the accessory olfactory system of male mice without physical contact. *Neuroscience* 141:551-8
- Nadeau JH, Balling R, Barsh G, Beier D, Brown SD, Bucan M, Camper S, et al. (2001) Sequence interpretation. Functional annotation of mouse genome sequences. *Science* 291:1251-5
- Nadeau JH, Singer JB, Matin A, Lander ES (2000) Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet* 24:221-5
- Nadler JJ, Moy SS, Dold G, Trang D, Simmons N, Perez A, Young NB, Barbaro RP, Piven J, Magnuson TR, Crawley JN (2004) Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes Brain Behav* 3:303-14

- Nagy MZ, Forrest EJ (1970) Open-Field behavior of C3H mice: Effect of size and illumination of field. *Psychon. Sci.* 20:19-21
- Nagy TR, Krzywanski D, Li J, Meleth S, Desmond R (2002) Effect of group vs. single housing on phenotypic variance in C57BL/6J mice. *Obes Res* 10:412-5
- Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B (2002) Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 36:20-42
- Niemeyer W, Starlinger I (1981) Do the blind hear better? Investigations on auditory processing in congenital or early acquired blindness. II. Central functions. *Audiology* 20:510-5
- Nikulina EM, Skrinskaya JA, Popova NK (1991) Role of genotype and dopamine receptors in behaviour of inbred mice in a forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 105:525-9
- Nobrega MA, Pennacchio LA (2004) Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. *J Physiol* 554:31-9
- Nolan PM, Peters J, Strivens M, Rogers D, Hagan J, Spurr N, Gray IC, et al. (2000) A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nat Genet* 25:440-3
- O'Brien T, Woychik R (2003) Our small relative. *Nat Genet* 33:3-4
- O'Brien TP, Frankel WN (2004) Moving forward with chemical mutagenesis in the mouse. *J Physiol* 554:13-21
- Ohl F, Holsboer F, Landgraf R (2001a) The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Methods Instrum Comput* 33:392-7
- Ohl F, Keck ME (2003) Behavioural screening in mutagenised mice--in search for novel animal models of psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* 480:219-28
- Ohl F, Oitzl MS, Fuchs E (1998) Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage. *J Neurosci Methods* 81:35-40
- Ohl F, Roedel A, Storch C, Holsboer F, Landgraf R (2002) Cognitive performance in rats differing in their inborn anxiety. *Behav Neurosci* 116:464-71
- Ohl F, Sillaber I, Binder E, Keck ME, Holsboer F (2001b) Differential analysis of behavior and diazepam-induced alterations in C57BL/6N and BALB/c mice using the modified hole board test. *J Psychiatr Res* 35:147-54
- Ohl F, Toschi N, Wigger A, Henniger MS, Landgraf R (2001c) Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav Neurosci* 115:429-36
- Pasche B, Kalaydjiev S, Franz TJ, Kremmer E, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Lengeling A, Busch DH (2005) Sex-dependent susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection is mediated by differential interleukin-10 production. *Infect Immun* 73:5952-60
- Paylor R, Spencer CM, Yuva-Paylor LA, Pieke-Dahl S (2006) The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. *Physiol Behav* 87:95-102
- Peirce JL, Derr R, Shendure J, Kolata T, Silver LM (1998) A major influence of sex-specific loci on alcohol preference in C57Bl/6 and DBA/2 inbred mice. *Mamm Genome* 9:942-8
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-67
- Pietropaolo S, Mintz M, Feldon J, Yee BK (2007) The behavioral sequela following the prevention of home-cage grid-climbing activity in C57BL/6 mice. *Behav Neurosci* 121:345-55
- Plappert CF, Pilz PK (2001) The acoustic startle response as an effective model for elucidating the effect of genes on the neural mechanism of behavior in mice. *Behav Brain Res* 125:183-8

- Post A, Ohl F, Almeida OF, Binder EB, Rucker M, Welt S, Binder E, Holsboer F, Sillaber I (2005) Identification of molecules potentially involved in mediating the in vivo actions of the corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist, NBI30775 (R121919). *Psychopharmacology (Berl)* 180:150-8
- Prehn A, Ohrt A, Sojka B, Ferstl R, Pause BM (2006) Chemosensory anxiety signals augment the startle reflex in humans. *Neurosci Lett* 394:127-30
- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3-33
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3:238-44
- Reeb-Whitaker CK, Paigen B, Beamer WG, Bronson RT, Churchill GA, Schweitzer IB, Myers DD (2001) The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. *Lab Anim* 35:58-73
- Reijmers LG, Coats JK, Pletcher MT, Wiltshire T, Tarantino LM, Mayford M (2006) A mutant mouse with a highly specific contextual fear-conditioning deficit found in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis screen. *Learn Mem* 13:143-9
- Renstrom A, Bjoring G, Hoglund AU (2001) Evaluation of individually ventilated cage systems for laboratory rodents: occupational health aspects. *Lab Anim* 35:42-50
- Restivo L, Chaillan FA, Ammassari-Teule M, Roman FS, Marchetti E (2006) Strain differences in rewarded discrimination learning using the olfactory tubing maze. *Behav Genet* 36:923-34
- Rex A, Voigt JP, Gustedt C, Beckett S, Fink H (2004) Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology (Berl)* 177:23-34
- Richter K, Wolf G, Engelmann M (2005) Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learn Mem* 12:407-13
- Rodgers RJ, Boullier E, Chatzimichalaki P, Cooper GD, Shorten A (2002) Contrasting phenotypes of C57BL/6J<sup>OlaHsd</sup>, 129S2/Sv<sup>Hsd</sup> and 129/Sv<sup>Ev</sup> mice in two exploration-based tests of anxiety-related behaviour. *Physiol Behav* 77:301-10
- Roedel A, Storch C, Holsboer F, Ohl F (2006) Effects of light or dark phase testing on behavioural and cognitive performance in DBA mice. *Lab Anim* 40:371-81
- Rossi-Arnaud C, Ammassari-Teule M (1998) What do comparative studies of inbred mice add to current investigations on the neural basis of spatial behaviors? *Exp Brain Res* 123:36-44
- Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziejczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, Grandy DK (1997) Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90:991-1001
- Russell LB (1989) Reciprocal relationship between mouse germ-cell mutagenesis and basic genetics: from early beginnings to future opportunities. *Environ Mol Mutagen* 14 Suppl 16:23-9
- Sankoorikal GM, Kaercher KA, Boon CJ, Lee JK, Brodtkin ES (2006) A mouse model system for genetic analysis of sociability: C57BL/6J versus BALB/cJ inbred mouse strains. *Biol Psychiatry* 59:415-23
- Seong E, Seasholtz AF, Burmeister M (2002) Mouse models for psychiatric disorders. *Trends Genet* 18:643-50
- Shearstone JR, Wang YE, Clement A, Allaire NE, Yang C, Worley DS, Carulli JP, Perrin S (2005) Application of functional genomic technologies in a mouse model of retinal degeneration. *Genomics* 85:309-21



- Shinozaki K, Maruyama K, Kume H, Kuzume H, Obata K (1997) A novel brain gene, norbin, induced by treatment of tetraethylammonium in rat hippocampal slice and accompanied with neurite-outgrowth in neuro 2a cells. *Biochem Biophys Res Commun* 240:766-71
- Shum FW, Ko SW, Lee YS, Kaang BK, Zhuo M (2005) Genetic alteration of anxiety and stress-like behavior in mice lacking CaMKIV. *Mol Pain* 1:22
- Smeltzer MD, Curtis JT, Aragona BJ, Wang Z (2006) Dopamine, oxytocin, and vasopressin receptor binding in the medial prefrontal cortex of monogamous and promiscuous voles. *Neurosci Lett* 394:146-51
- Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W, Lee KF (1998) Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20:1093-102
- Soewarto D, Fella C, Teubner A, Rathkolb B, Pargent W, Heffner S, Marschall S, Wolf E, Balling R, Hrabe de Angelis M (2000) The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen. *Mamm Genome* 11:507-10
- Spruijt BM, van Hooff JA, Gispen WH (1992) Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev* 72:825-52
- Stairs DJ, Klein ED, Bardo MT (2006) Effects of environmental enrichment on extinction and reinstatement of amphetamine self-administration and sucrose-maintained responding. *Behav Pharmacol* 17:597-604
- Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP (2001) Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2:756-68
- Strasser S, Dixon AK (1986) Effects of visual and acoustic deprivation on agonistic behaviour of the albino mouse (*M. musculus* L.). *Physiol Behav* 36:773-8
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM (2002) Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 3:391-7
- Takao K, Miyakawa T (2006) Investigating gene-to-behavior pathways in psychiatric disorders: the use of a comprehensive behavioral test battery on genetically engineered mice. *Ann N Y Acad Sci* 1086:144-59
- Tarantino LM, Bucan M (2000) Dissection of behavior and psychiatric disorders using the mouse as a model. *Hum Mol Genet* 9:953-65
- Tarantino LM, Gould TJ, Druhan JP, Bucan M (2000) Behavior and mutagenesis screens: the importance of baseline analysis of inbred strains. *Mamm Genome* 11:555-64
- Terranova ML, Laviola G, Alleva E (1993) Ontogeny of amicable social behavior in the mouse: gender differences and ongoing isolation outcomes. *Dev Psychobiol* 26:467-81
- Thaung C, Arnold K, Jackson IJ, Coffey PJ (2002) Presence of visual head tracking differentiates normal sighted from retinal degenerate mice. *Neurosci Lett* 325:21-4
- Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 19:162-6
- Tonissaar M, Philips MA, Eller M, Harro J (2004) Sociability trait and serotonin metabolism in the rat social interaction test. *Neurosci Lett* 367:309-12
- Trullas R, Skolnick P (1993) Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 111:323-31
- Tsai PP, Oppermann D, Stelzer HD, Mahler M, Hackbarth H (2003a) The effects of different rack systems on the breeding performance of DBA/2 mice. *Lab Anim* 37:44-53
- Tsai PP, Pachowsky U, Stelzer HD, Hackbarth H (2002) Impact of environmental enrichment in mice. 1: effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab Anim* 36:411-9

- Tsai PP, Stelzer HD, Hedrich HJ, Hackbarth H (2003b) Are the effects of different enrichment designs on the physiology and behaviour of DBA/2 mice consistent? *Lab Anim* 37:314-27
- Tucci V, Lad HV, Parker A, Polley S, Brown SD, Nolan PM (2006) Gene-environment interactions differentially affect mouse strain behavioral parameters. *Mamm Genome* 17:1113-20
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-7
- Vaynman S, Gomez-Pinilla F (2005) License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehabil Neural Repair* 19:283-95
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-51
- Ventura R, Morrone C, Puglisi-Allegra S (2007) Prefrontal/accumbal catecholamine system determines motivational salience attribution to both reward- and aversion-related stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5181-6
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264:719-25
- Voikar V, Koks S, Vasar E, Rauvala H (2001) Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 72:271-81
- Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E (2003) Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. *Behav Brain Res* 140:141-7
- Voller J, Cendelin J, Tonar Z, Korelusova I, Vozeh F (2005) Functional consequences of retinal degeneration in spatial orientation in C3H wild type and Lurcher mutant mice. *Prague Med Rep* 106:85-90
- Wahlsten D (2001) Standardizing tests of mouse behavior: reasons, recommendations, and reality. *Physiol Behav* 73:695-704
- Wiesenfeld-Hallin Z (2005) Sex differences in pain perception. *Gend Med* 2:137-45
- Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5:483-94
- Wolfer DP, Lipp HP (2000) Dissecting the behaviour of transgenic mice: is it the mutation, the genetic background, or the environment? *Exp Physiol* 85:627-34
- Wolfer DP, Litvin O, Morf S, Nitsch RM, Lipp HP, Wurbel H (2004) Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour. *Nature* 432:821-2
- Wong AA, Brown RE (2006) Visual detection, pattern discrimination and visual acuity in 14 strains of mice. *Genes Brain Behav* 5:389-403
- Young LJ (2001) Oxytocin and Vasopressin as Candidate Genes for Psychiatric Disorders: Lessons From Animal Models. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 105:53-54
- Zheng Q, Johnson K, Erway L (1999) Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hearing Research* 130:94-107

## 7 DANKSAGUNG

Prof. Dr. Wolfgang Wurst hat es mir ermöglicht, diese Dissertation am Institut für Entwicklungsgenetik in der Verhaltensgruppe durchzuführen. Darüber hinaus konnte ich im Verhaltensmodul sowie an den EU-Projekte EUMORPHIA und EUMODIC aktiv mitarbeiten. Für diese Möglichkeiten und damit verbundenen positiven Erfahrungen bedanke ich mich sehr.

Die Leitung der Verhaltensgruppe am IDG hatte Dr. Sabine M. Hölter-Koch. Vielen Dank für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit, die fruchtbaren Diskussionen und der Einbindung in weitere Projekte. Susanne Sommer und Cornelia Schneider danke ich für die Hilfe bei den mHB-Versuchen. Ein ebenfalls großes Dankeschön meinen Mitdotorandinnen Barbara Di Benedetto und Karin Weindl für die Themen-gebunden Anregungen, aber auch für den tollen Zusammenhalt und Spaß, welche vieles erleichterten. Der gesamten Verhaltensgruppe danke ich für das gute Arbeitsklima und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Die Haltungs-Experimente wurden zum Teil mit Prof. Dr. Jörg Schmidt von der AVM sowie Dr. Ralf Elvert (Metabolism GMC) und Dr. Helmut Fuchs (Dysmorphology GMC) konzipiert. Vielen Dank für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an Dr. Thomas Floss und Dr. Rouzanna Istvanffy für die Überlassung der Neurochondrin-Mäuse zur Verhaltensanalyse.

Ein weiteres Dankeschön geht an Dr. Gerhard Welzl und Theresa Faus-Kessler für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Bei Dr. Daniela Vogt Weisenhorn bedanke ich mich neben den wissenschaftlichen Diskussionen für die Hilfe bei administrativen Belangen.

Ein großes Dankeschön geht an das gesamte GMC-Team für die freundliche Aufnahme und Unterstützung sowie konstruktive Zusammenarbeit innerhalb des Workflows. Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis, Leiter der GMC, danke ich darüber hinaus für seine Bereitschaft, die Aufgabe des Zweitprüfers zu übernehmen, und Prof. Dr. Siegfried Scherer für den Prüfungsvorsitz.

Zu guter Letzt geht ein ganz herzliches Dankeschön auch an Christoph, Mama und Papa, Peter und Isabel und alle, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und über diese Arbeit hinaus unterstützen werden.



## 8 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name	Kallnik
Vorname	Magdalena Anna
Geburtsdatum	29.10.1977
Geburtsort	Ruda Slaska / Polen
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Ausbildungsdaten:

#### Schule:

1984-1985	Grundschule, Düsseldorf
1985-1988	Wittelsbacher-Grundschule, Germering
1988-1997	Max-Born-Gymnasium, Germering, Abschluss: Abitur

1992-1994	Tutorentätigkeit
1990-1997	Orchester, Geige

#### Studium:

	Studiengang Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien
--	--

09.09.1997-19.10.1999	an der Technischen Universität München
19.10.1999-31.12.2003	an der Ludwig-Maximilians-Universität München

SS 1999	Zwischenprüfung
---------	-----------------

WS 2001/2002	Zulassungsarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München am Thema: „Einfluss von wiederholter Alkohol-deprivation und chronischem Social Defeat-Stress auf den Alkoholkonsum bei Mäusen“
--------------	--

August – Dezember 2002	Erstes Staatsexamen in den Erziehungswissenschaften
August – Dezember 2003	Erstes Staatsexamen in den Fachwissenschaften

#### Studentische Hilfskraft:

01.11.01-31.01.02 und 01.07.02-31.12.02	am Institut für Entwicklungsgenetik an der GSF/Neuherberg
--	---

#### Promotion:

seit Februar 2004 bis jetzt	am Institut für Entwicklungsgenetik an der GSF/Neuherberg; Thema: „Evaluation des modified Hole Boards als Primärscreen für mutante Mauslinien“
-----------------------------	--

## 9 PUBLIKATIONEN

### 2005

- 1) Holter SM, Kallnik M, Wurst W, Marsicano G, Lutz B, Wotjak CT. *Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task*. Eur J Pharmacol 510:69-74
- 2) Brown SD, Chambon P, de Angelis MH, Eumorphia Consortium (including Wurst W, Hölter SM, Kallnik M and Vogt Weisenhorn D). *EMPreSS: standardized phenotype screens for functional annotation of the mouse genome*. Nat Genet 37:1155

### 2007

- 1) Kallnik M, Elvert R, Ehrhardt N, Kissling D, Mahabir E, Welzl G, Faus-Kessler T, de Angelis MH, Wurst W, Schmidt J, Holter SM. *Impact of IVC housing on emotionality and fear learning in male C3HeB/FeJ and C57BL/6J mice*. Mamm Genome 18:173-186

### Abstracts:

#### 2004

- 1) Kallnik M, Hölter S, Wurst W, Ehrhardt N, Elvert R, Fuchs H, Schmidt J. *Impact of housing conditions on modified Hole Board, Acoustic Startle Response, Prepulse Inhibition and Grip Strength results in C3HeB/FeJ male mice*. 3<sup>rd</sup> Weimar Conference of Genetics, September
- 2) Istvánffy R, Vogt Weisenhorn D, Kallnik M, Hölter SM, Faus T, Floss T and Wurst W. *A possible role of Neurochondrin (ncdn) in female fertility*. 3<sup>rd</sup> Weimar Conference of Genetics, September

#### 2005

- 1) Kallnik M, Fuchs H, Elvert R, Ehrhardt N, Kissling D, Mahabir E, Wurst W, Schmidt J, Hölter SM. *Housing conditions modulate emotionality and cognitive function in single housed male C3HeB/FeJ and C57BL/6J mice*. NGFN Meeting, Bonn, November, p. 172.
- 2) Hölter SM, Schneider C, Kallnik M, Weindl K, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabé de Angelis M, Wurst W. *Phenotyping methods in the Behavioral Unit of the German Mouse Clinic*. NGFN Meeting, Bonn, November, p. 183.
- 3) Pham TT, Vogt Weisenhorn DM, Floss T, Hoelter S, Kallnik M, Roethig A, Prokisch H, Ahting U, Kahle P, Goerner K, and Wurst W. *DJ-1 deficient mice are not impaired in locomotion but do show a social behaviour phenotype*. NGFN Meeting, Bonn, November, p. 188.
- 4) Istvanffy R, Vogt Weisenhorn D, Floss T, Hölter S, Kallnik M, Faus-Kessler T, Pedersen V, Wurst W. *A possible involvement of neurochondrin in dopamine signalling via the D2R in the pituitary*. Society for Neuroscience 35<sup>th</sup> Annual meeting, Washington D.C., November, Program Nr: 242.7.

**2006**

- 1) Kallnik M, Schneider C, Kneuttinger R, Wurst W, Hölder SM. *The modified Hole Board Test as a sensitive primary behavioural screen*. NGFN Meeting, Heidelberg, November, p. 115.
- 2) Kallnik M, Fuchs H, Elvert R, Ehrhardt N, Kissling D, Mahabir E, Wurst W, Schmidt J, Hölder SM. *Housing conditions modulate emotionality and cognitive function in single housed male C3HeB/FeJ and C57BL/6J mice*. EUMORPHIA 3<sup>rd</sup> Annual Project Meeting, Barcelona, February.
- 3) Hölder SM, Schneider C, Kallnik M, Weindl K, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabé de Angelis M, Wurst W. *Phenotyping methods in the Behavioral Unit of the German Mouse Clinic*. EUMORPHIA 3<sup>rd</sup> Annual Project Meeting, Barcelona, February.
- 4) Mandillo S, Hölder SM, Al Banchaabouchi M, Auwerx J, Brown S, Chambon P, Gale K, Golini E, Hardy A, Kallnik M, Krezel W, Lad H, Marazziti D, Meziane H, Nolan P, Ouagazzal A, Parker A, Riet F, Rosenthal N, Tocchini-Valentini G, Tucci V, Weindl K, Wurst W. *Behavioural Phenotyping: validation across laboratories and implementation of SOPs in Eumorphia WP9-10 centres*. EUMORPHIA 3<sup>rd</sup> Annual Project Meeting, Barcelona, February.
- 5) Fuchs H, Gailus-Durner V, Abe K, Lisse T, Becker L, Blatny R, Bolle I, Calzada-Wack J, Ehrhardt N, Dalke C, Hölder SM, Hölzlwimmer G, Horsch M, Ivanek R, Javaheri A, Aguilar A, Kalaydjiev S, Adler T, Kling E, Kunder S, Lengger C, Maier H, Naton B, Prehn C, Racz I, Rathkolb B, Rozman J, Schrewe A, Steinkamp R, Thiele F, Kallnik M, Di Benedetto B, Adamski J, Beckers J, Behrendt H, Busch DH, Favor J, Graw J, Heldmaier G, Höfler H, Ivandic B, Jakob T, Katus H, Klingenspor M, Klopstock T, Lengeling A, Müller W, Ollert M, Quintanilla-Martinez L, Schulz H, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Forejt J and Hrabé de Angelis M. *A new standard: Phenotyping in the German Mouse Clinic*. Mouse Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, August/September 2006.

**2007**

- 1) Enard W, Gehre S, Hammerschmidt K, Brückner MK, Giger T, Hölder SM, Kallnik M, Becker L, Groszner M, Müller U, Gailus-Durner V, Fuchs H, G. Mouse Clinic Consortium, Klopstock T, Wurst W, Fisher SE, Arendt T, Hrabé de Angelis M, Fischer J, Schwarz J, Pääbo S. *A mouse model for human-specific changes in FOXP2, a gene important for speech and language*. Society for Neuroscience 37<sup>th</sup> Annual meeting, San Diego, November

**Oral presentations:**

- 1) Scanbur BK, 9<sup>th</sup> International Seminar: Allergy Control - Standardisation - Transgenic Rat, June 2006. Kallnik M. *Standardisation in behavioural phenotyping of mouse mutants*.
- 2) Eumodic start up meeting, Barcelona, February 2007. Kallnik M. *Study on gene-environment interactions in behavioral phenotyping*.

## **10 ERKLÄRUNG**

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, Magdalena Kallnik, dass die eingereichte Dissertation meine erste ist. Es gab keinen früheren Versuch eine Dissertation einzureichen oder sich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist.

Magdalena Kallnik