

Institut für Ernährungswissenschaft
Abteilung für Ernährungstoxikologie

**Charakterisierung von Stereotypen bei der FVB/NJ-Maus
hinsichtlich metabolischer und immunologischer Aspekte
auf die Stoffwechsellleistung**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Ernährungstoxikologie“**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
Tina Nitezki**

Potsdam, Juni 2017

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung 4.0 International
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Erstgutachter: Prof. Dr. B. Kleuser
Zweitgutachter: PD Dr. habil. S. Krämer
Drittgutachter: Prof. Dr. B. Hiebl
Mentor: Dr. V. Kral

Tag der Einreichung: 21.06.2017

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-402265
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-402265>

Meinen Schwestern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Das 3R-Konzept von Russell und Burch	2
2.2	Die BB3R-Forschungsplattform	4
2.3	Refinement im Fokus	4
2.4	Die Geschichte der Labormaus	5
2.5	Die FVB/NJ-Maus	6
2.6	Vorkommen stereotypen Verhaltens	7
2.7	Standardisierung der Haltungsbedingungen	7
2.8	Normalverhalten der Maus	8
2.9	Verhaltensanpassung	10
2.10	Entstehung stereotypen Verhaltens	11
2.11	Prävention stereotypen Verhaltens	14
2.12	Individualität und Animal Personality	16
3	Zielsetzung	19
4	Eigene Untersuchungen	20
4.1	Tierversuch	20
4.1.1	Tiere und Tierhaltung	20
4.2	Studiendesign	21
4.2.1	Parentalgeneration	21
4.2.2	Nachzucht	22
4.3	<i>In vivo</i> Methoden	22
4.3.1	Videoüberwachung	22
4.3.2	Maternales Verhalten	23
4.3.3	Nachzuchtverhalten	25
4.3.4	Open Field Test	27
4.3.5	Indirekte Tierkalorimetrie	30
4.3.6	Blutentnahmen	31
4.3.7	Blutanalyse	31
4.3.8	Bestimmung des Körpergewichts	31
4.3.9	Sammlung fäkaler Proben	31
4.3.10	Bestimmung der Körperzusammensetzung	32
4.3.11	Euthanasie	32

4.3.12	Bestimmung der Körperlänge.....	32
4.3.13	Sektion	32
4.4	Labordiagnostische Methoden	34
4.4.1	Analyse der fäkalen Corticosteroide	34
4.4.2	Analyse von Dopamin und Serotonin im Gehirn.....	35
4.4.3	Glykogenbestimmung in Leber und Muskel	36
4.4.4	Triglyceridbestimmung im Muskel.....	37
4.5	Histologische Methoden.....	38
4.5.1	Probenaufbereitung	38
4.5.2	Färbungen.....	38
4.5.3	Kardiomyozytenflächen	40
4.5.4	Kardiomyozytendiameter	40
4.5.5	Kollagenanteil des Herzens.....	40
4.5.6	Muskelquerschnittsfläche des <i>M. soleus</i>	42
4.5.7	Anzahl der Myozyten des <i>M. soleus</i>	42
4.5.8	Diameter der Myozyten des <i>M. soleus</i>	42
4.5.9	Diameter der Myozyten des <i>M. quadriceps</i>	43
4.5.10	Kollagenanteil des <i>M. soleus</i>	43
4.5.11	Kollagenanteil <i>M. quadriceps</i>	43
4.5.12	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) der Milz.....	44
4.5.13	Material	45
4.5.14	Statistik	49
5	Ergebnisse	50
5.1	Zuchtparameter	50
5.2	Variabilität und Transmission stereotypen Verhaltens.....	51
5.3	Maternales Verhalten	51
5.4	Nachzuchtverhalten	53
5.4.1	Entwicklung des stereotypen Verhaltens der Nachkommen	53
5.4.2	Aktivität und circadiane Rhythmik	55
5.4.3	Detailliertes Verhalten der Nachkommen	57
5.5	Open Field Test.....	58
5.5.1	Exploratives Verhalten	59
5.5.2	Aktivität.....	61
5.5.3	Rotationen	62
5.5.4	Zurückgelegte Distanzen	64
5.5.5	Geschwindigkeiten.....	65

5.6	Indirekte Tierkalorimetrie	67
5.6.1	Zurückgelegte Distanzen	67
5.6.2	Futter- und Wasseraufnahme.....	68
5.7	Körpergewichtsentwicklung	69
5.8	Körperzusammensetzung	71
5.9	Körperlänge, Organgewichte.....	72
5.9.1	Körperlänge.....	72
5.9.2	Organgewichte.....	74
5.10	Fäkale Corticosteroide.....	77
5.11	Neurotransmitter des Gehirns	79
5.12	Glykogengehalte der Leber und des Muskels	80
5.12.1	Glykogengehalt der Leber.....	80
5.12.2	Glykogengehalt des Muskels	81
5.13	Triglyceridgehalt des Muskels.....	82
5.14	Histologische Parameter des Herzens.....	83
5.14.1	Kardiomyozytenflächen	83
5.14.2	Kardiomyozytendiameter	84
5.14.3	Kollagenanteil des Herzen	85
5.15	Histologische Parameter der Skelettmuskulatur.....	86
5.15.1	Muskelquerschnitt des <i>M. soleus</i>	86
5.15.2	Anzahl der Myozyten des <i>M. soleus</i>	87
5.15.3	Diameter der Myozyten des <i>M. soleus</i>	88
5.15.4	Kollagenanteil des <i>M. soleus</i>	89
5.15.5	Diameter der Myozyten des <i>M. quadriceps</i>	90
5.15.6	Kollagenanteil des <i>M. quadriceps</i>	91
5.16	PCNA-positive Zellen der Milz.....	92
6	Diskussion	93
6.1	Einfluss des maternalen Verhaltens auf die Entwicklung von Stereotypen	93
6.2	Einfluss stereotypen Verhaltens auf das Explorations- und Raumnutzungsverhalten.....	94
6.3	Auswirkungen stereotypen Verhaltens auf die physische Fitness und den metabolischen Phänotyp.....	97
6.4	Auswirkungen stereotypen Verhaltens auf das Wohlbefinden von Tieren.....	104
6.5	Auswirkungen stereotypen Verhaltens auf die Ergebnisse tierexperimenteller Studien	113

7	Zusammenfassung	117
8	Summary	120
A	Literaturverzeichnis	122
B	Abkürzungsverzeichnis	136
C	Abbildungen und Tabellen	138
C.1	Abbildungen	138
C.2	Tabellen	139
D	Danksagung	140
E	Lebenslauf	142
F	Veröffentlichungen	143
G	Eidesstaatliche Erklärung	144
H	Anhang	145
H.1	Ergebnisse der Blutentnahmen.....	145
H.2	Körpergewicht und Körperzusammensetzung	146
H.3	Gehirnarealspezifische SRT- und DA-Bestimmung.....	147

1 Einleitung

Im tierexperimentellen Kontext bedeutet Refinement, das speziesspezifische Normalverhalten, das Wohlbefinden und die Gesundheit von zu Versuchszwecken gehaltenen Tieren zu fördern und jegliche Methoden zu verbessern, sodass potentielle Belastungen, Schmerzen oder Distress auf ein absolutes Minimum reduziert werden. Dabei sollen alle Lebensphasen eines Tieres einbezogen werden. Neben der artgerechten Zucht und dem schonenden Transport der Versuchstiere, tragen optimierte Haltungsbedingungen und tierschonende Verfahren während der Durchführung des Versuchs zum Refinement bei. Laut den Entwicklern des 3R-Konzepts, RUSSELL und BURCH, ist das Anwenden von Refinement-Verfahren allein jedoch nicht ausreichend. Die Forscher sollten stets danach streben, die Anzahl der verwendeten Versuchstiere und der durchgeführten Versuche generell zu reduzieren (Reduction) und wenn möglich, Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (Replacement) anwenden. Kann in der spezifischen Fragestellung jedoch nicht auf das Tierexperiment verzichtet werden, so soll das Refinement Anwendung finden. Dabei ist ein grundlegendes Verständnis über die Spezies, mit der in dem Versuch gearbeitet werden soll, der Ausgangspunkt, um ein maximales Refinement zu erreichen. Das Wissen über die physiologischen Bedürfnisse und die speziesspezifischen Verhaltensansprüche ist notwendig, um Tieren ein hohes Maß an Wohlbefinden zu garantieren. Die standardisierten Bedingungen der Labortierhaltung weichen in verschiedenen Aspekten (z.B. der Ressourcenverfügbarkeit, dem Platzangebot, den Kommunikationsmöglichkeiten) von den natürlichen Bedingungen ab. Individuell unterschiedlich können sich Tiere bis zu einem gewissen Maß an sich ändernde Umweltbedingungen anpassen. Grundlage eines artgerechten und speziesspezifischen Refinements bildet die Kenntnis über das Normalverhalten der Spezies. Diese Arbeit trägt dazu bei, Abweichungen von diesem Normalverhalten (hier: Stereotypen) zu erkennen und interpretieren zu können. Dazu wird das (stereotype) Verhalten der FVB/NJ-Mäuse, exemplarisch für stereotype Mauslinien, detailliert charakterisiert und systematisch zusammengetragen, welche Konsequenzen stereotypes Verhalten für den Metabolismus, die physische Fitness und das Profil von Stresshormonen und Neurotransmittern hat. Das so gewonnene Wissen soll helfen, Empfehlungen zur Verwendung stereotyper Tiere in Studien mit tierexperimentellem Schwerpunkt auszusprechen, das grundlegende Verständnis über Stereotypen zu erweitern und so einen grundlegenden Beitrag zum Refinement zu leisten.

2 Literaturübersicht

2.1 Das 3R-Konzept von Russell und Burch

Im Jahr 1954 beauftragte die Universities Federation for Animal Welfare William Moy Stratten Russell, einen Bericht über die Fortschritte der tiergerechten Forschung im Labor zu schreiben. Unterstützt wurde Russell dabei von Rex Burch, dessen Beitrag vor allem im Führen von Interviews mit anderen Forschern und der Datensammlung bestand. Aus dieser Zusammenarbeit entstand im Jahr 1959 ein Bericht mit dem Titel „Principles of Humane Experimental Technique“ (Russell and Burch, 1959; Tannenbaum and Bennett, 2015), der den Grundstein für das 3R-Konzept legte. Russell und Burch verfolgten damals das Ziel, darauf aufmerksam zu machen, dass eine humane Wissenschaft gute Wissenschaft bedeute und um dies zu erreichen, der beste Weg die Anwendung der 3R sei. Um den Begriff „human“ näher zu erläutern, entwickelten sie das Konzept der Unmenschlichkeit („*Concept of Inhumanity*“). Es seien grundsätzlich zwei Arten der Unmenschlichkeit, die im Rahmen des tierexperimentellen Arbeitens relevant sein können, zu unterscheiden. Die direkte Unmenschlichkeit ist als eine unvermeidbare Folge des angewandten Verfahrens zu verstehen. So ist z.B. zur Prüfung der Wirksamkeit von Analgetika das Zufügen von gewissen Schmerzen notwendig. Die zufällige, bzw. bedingte („*contingent*“) Unmenschlichkeit bezeichnet das Verursachen von Distress, als zufälliges und unbeabsichtigtes Nebenprodukt der Anwendung eines Verfahrens, welches für seinen Erfolg jedoch nicht notwendig ist. Dazu zählen z.B. die inadäquate Haltung von Versuchstieren und der nicht-fachgerechte Umgang mit Tieren. Russell und Burch betonen, dass beide Formen der Unmenschlichkeit durch die Anwendung der 3R eliminiert, oder zumindest auf ein Minimum reduziert, werden können. Die Entwicklung des 3R-Konzepts sollte als eine Chance betrachtet werden und nicht als eine Einschränkung für die Forschung. Das Konzept bekräftigt, welche Prinzipien der tiergerechten (humanen) Forschung zugrunde liegen und welche Aspekte bei der Planung von Tierversuchen zu beachten sind.

Mit dem Gebot des **Replacements** (Ersatz, Vermeidung) werden Forscher angehalten vor Durchführung eines Tierversuchs zu prüfen, ob das verfolgte Versuchsziel mit anderen Methoden als dem Tierversuch erreicht werden kann. Zum Replacement zählt jede wissenschaftliche Methode, die im Verlauf des Versuchs Interventionen an Wirbeltieren ersetzt, indem nicht-empfindungsfähiges Material zum Einsatz kommt. Unterschieden wird hier zwischen relativem und absolutem Replacement. Beim relativen Replacement werden, z.B. zur Generierung von Zellkulturen oder *Ex-vivo*-Modellen, Tiere verwendet, dem eigentlichen Versuch werden sie jedoch nicht ausgesetzt. Das absolute Replacement verzichtet auf jeder Ebene des geplanten Experiments auf die Verwendung von Tieren. Es stellt laut Russell und Burch demnach das absolute Ideal dar. Hierzu zählen u.a.

Computersimulationen (*in silico*) und die *in-vitro*-Nachstellung von Prozessen. Kommt man nach Prüfung der etablierten Ersatzmethoden zu dem Schluss, dass der Tierversuch notwendig ist, soll nach dem Gebot der **Reduction** (Reduzierung, Verminderung) zumindest die Anzahl der eingesetzten Versuchstiere auf ein unerlässliches Maß reduziert werden. Ausgehend von einer präzisen statistischen Planung, darf die wissenschaftliche Aussagekraft dabei nicht verloren gehen. Des Weiteren sollen nach dem Prinzip der Reduction möglichst viele Informationen von den verwendeten Tieren gewonnen werden. Demnach zählen neben der Statistik u.a. auch der intra- und interinstitutionelle Austausch von gewonnenen Geweben, Organen, Präparaten etc., die zum Verfolgen des ursprünglichen Versuchsziels nicht von primärem Interesse waren, zu den Methoden der Reduction. Als drittes Gebot besagt das **Refinement** (Verfeinern, Verbessern), dass im Rahmen eines unerlässlichen Versuchs, die Belastungen, denen die Tiere ausgesetzt sind, so gering wie möglich gehalten werden sollen. Dies bezieht sich auf alle Lebensphasen eines Versuchstieres: vom stressfreien und schonenden Transport der Tiere über eine adäquate Haltung, bis hin zu Methoden, die Distress und Schmerzen während des Einsatzes der Tiere im Versuch auf ein Mindestmaß reduzieren. Russell und Burch heben hervor, dass man sich mit dem alleinigen Refinement von Tierversuchen nicht zufrieden stellen sollte und, dass der Fokus auf der fortschreitenden Etablierung von Replacement- und Reduction-Methoden liegt. Keines der 3R's kann isoliert betrachtet werden und alleinig dazu führen, dass Tierversuche humaner gestaltet werden. Sie sind eher als ein Netzwerk zu verstehen. Angepasste Schmerztherapien bei Tieren, die z.B. in invasiven Versuchen mit chirurgischem Hintergrund eingesetzt werden, führen demzufolge nicht nur zu einer geringeren Belastung für das Tier und tragen damit zum Refinement bei. Durch die, aufgrund des Analgetika-Einsatzes zu erwartende, geringere Anzahl verstorbener Tiere wird dadurch ebenfalls ein Beitrag zur Reduction geleistet.

Nachdem Russell und Burch's Werk veröffentlicht wurde, verging etwas Zeit bis das 3R-Prinzip ausgedehnte Anwendung fand. Diverse Tierschutzbewegungen Ende der 1970er Jahre und die zunehmend sensibilisierte Öffentlichkeit begannen Tierversuche vermehrt zu hinterfragen und regten zum Umdenken an. Mit fortschreitender Etablierung von Ersatzmethoden gewann auch das 3R-Konzept an Bedeutung. Ein Beitrag zu dieser Entwicklung wurde in den 1980er Jahren geleistet. Aufgrund der Verwendung von Nährmedien und Antibiotika wiesen Zellkulturen künftig längere Überlebenszeiten auf und kamen demnach verstärkt zur Anwendung. Durch die flächendeckende Bereitstellung leistungsfähiger Computer ergab sich ein weiteres Voranschreiten bezüglich der Etablierung von Replacement-Methoden. Fortan konnten so z.B. Interaktionen zwischen bestimmten Stoffen und Zellen simuliert werden und der Begriff *in-silico*-Verfahren wurde geprägt. Mittlerweile sind Russell und Burch's 3R fest in der nationalen und internationalen Gesetzgebung verankert. Durch die Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für

wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, dessen vierter Artikel die europäischen Mitgliedsstaaten auf den Grundsatz der „Vermeidung, Verminderung und Verbesserung“ festlegt, erfuhr das 3R-Prinzip fortan auch gesetzliche Anerkennung. Mit der Novellierung des deutschen Tierschutzgesetzes im Jahr 2013 und mit der Tierschutz-Versuchstierverordnung wurden die Bestimmungen der Europäischen Richtlinie, und somit auch das 3R-Konzept, in nationales Recht umgesetzt. Demzufolge muss seitdem jede(r) Wissenschaftler/in im Rahmen des Genehmigungsverfahrens zum Tierversuch schriftlich präzise darlegen und wissenschaftlich begründen, warum diese konkrete Fragestellung nicht mit Hilfe von Ersatzmethoden beantwortet werden kann und welche Methoden eingesetzt werden, um maximal der Reduction und dem Refinement gerecht zu werden.

2.2 Die BB3R-Forschungsplattform

Ziel der 2014 gegründeten BB3R-Forschungsplattform mit integrierter Graduiertenschule ist es, systematische Forschung zu Alternativmethoden und tierschonenden Arbeitstechniken voranzutreiben und exzellente Nachwuchswissenschaftler auf hohem Niveau zu qualifizieren (Schaefer-Korting et al., 2015). Das 3R-Prinzip wird zunehmend zum gemeinsamen Bezugspunkt diverser Organisationen und Initiativen. BB3R setzt sich dafür ein, 3R-bezogene Kompetenzen der Region Berlin-Brandenburg zu bündeln und ein Netzwerk mit staatlichen Institutionen, Verbänden und der pharmazeutischen Industrie herzustellen. Das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Verbundprojekt der Freien Universität Berlin, der Universität Potsdam, der Charité Berlin, der Technischen Universität Berlin, des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und des Zuse-Instituts soll darüber hinaus der Schaffung eines 3R-Expertenpools für die Beratung in Fragen der Forschung und Ausbildung dienen. Ein zentrales Anliegen der BB3R-Forschungsplattform ist es außerdem, einen Wissenstransfer in die Öffentlichkeit durch Print- und elektronische Medien zu gewährleisten. Im Rahmen von BB3R werden mehrere Teilprojekte bearbeitet, dazu zählen die Etablierung und Weiterentwicklung von Krankheitsmodellen der Haut, die Optimierung der Organ-on-a-chip-Plattform, die Etablierung einer Testplattform der Immunologie und der Nanotoxikologie und Computerbasierte Methoden zur Wirkstoff- und Risikoanalyse. Auf Ebene des Refinements wurden bzw. werden, neben dem Projekt der vorliegenden Dissertation, Entscheidungsgrundlagen für die Zulassung von Mehrfachversuchen an Nagern und Großtieren erarbeitet und eine individuelle Schmerztherapie für diverse Mausstämme entwickelt.

2.3 Refinement im Fokus

Zum Refinement von Versuchen mit tierexperimentellem Schwerpunkt tragen alle Maßnahmen bei, die positive Zustände (z.B. das Wohlbefinden der Tiere) fördern und/oder negative Erfahrungen (z.B. Schmerzen und Stress) minimieren. Die Aufrechterhaltung der Gesundheit der Tiere wird dabei durch tierärztliche Betreuung, Richtlinien und Gesetze

gewährleistet. Hierzu zählt auch die Sicherstellung des psychologischen Wohlergehens der Tiere, welches z.B. durch Training mittels positiver Verstärkung im Versuchsdesign integriert werden kann. Um den Versuchstieren den größtmöglichen Komfort anzubieten, müssen sie auch die Möglichkeit haben, sich artgerecht zu entwickeln und zu verhalten. Ist ein Tier nicht in der Lage speziesspezifisches Verhalten auszuüben, kann dies Distress verursachen. Distress ergibt sich aus einem aversiven, negativen Zustand, den ein Tier nicht bewältigen kann oder an den es sich nicht anpassen kann und in dem das Tier demnach nicht in einen Zustand der Homöostase zurückkehren kann. Dieser Stress vermag laut ZURLO und HUTCHINSON (Zurlo and Hutchinson, 2014) weniger offensichtlich zu sein als andere aversive Situationen, wie z.B. Schmerzen, jedoch kann durch die Tatsache hoch motiviertes Verhalten nicht ausleben zu können, das Wohlbefinden von Tieren beeinträchtigt werden. Das umfassende Verständnis der Bedürfnisse der Spezies, mit der wir arbeiten, bildet die Grundlage um Verhaltensansprüche zu definieren, dessen Gemütszustand beurteilen zu können und demnach zu erkennen, inwiefern ihr Wohlbefinden in positiver oder negativer Weise beeinflusst wird.

Das bedeutet bezüglich des Themenkomplexes der vorliegenden Arbeit, dass Stereotypen in erster Linie ausreichend verstanden werden müssen, um ihre Auswirkungen auf den mentalen Zustand des Tieres beurteilen zu können. Die Grundlage eines umfassenden Verständnisses bildet hierbei die detaillierte Charakterisierung stereotypen Verhaltens und die systematische Darstellung der Konsequenzen, die Stereotypen für das jeweilige Tier haben und leistet damit einen grundlegenden Beitrag zum Refinement. Um das Verhalten von Labornagern zu verstehen und mögliche Abweichungen interpretieren zu können, muss die Phylogenese (stammesgeschichtliche Entwicklung) der Maus berücksichtigt werden.

2.4 Die Geschichte der Labormaus

Die Maus, die heute als Versuchstier eingesetzt wird, gehört zur Ordnung der *Rodentia*, der Familie der *Muridae*, der Gattung *Mus* und der Spezies *Mus musculus*. Genetische Studien haben gezeigt, dass nahezu alle Inzuchtmausstämme, die in der derzeitigen Versuchstierkunde Anwendung finden, sich durch ein Genom auszeichnen, das auf die *Mus musculus domesticus*, *Mus musculus musculus* und *Mus musculus castaneus* zurückzuführen ist (Hedrich and Bullock, 2004). Zusätzlich trägt das Genom von *Mus musculus molossinus* (Cross-Hybrid von *M. m. musculus* und *M. m. castaneus*) zum Genom der heutigen Labormaus bei. Der geographische Ursprung der Spezies *Mus musculus* befindet sich auf dem indischen Kontinent. Von dort aus verteilten sich die verschiedenen Subspezies über den gesamten Globus. *M. m. domesticus* folgte europäischen Migranten und verbreitete sich so vorrangig in Westeuropa, Afrika, dem Nahen Osten, Amerika und Australien. *M. m. musculus* verbreitete sich über Osteuropa bis nach Japan. *M. m. castaneus* verweilte vor allem in Südostasien. Die Mäuse dieser Subspezies unterscheiden

sich nicht nur in äußerlichen Merkmalen, wie der Fell- und Augenfarbe, auch konnten bei Wildfängen verschiedene Verhaltensmerkmale verzeichnet werden. Mit zunehmendem Interesse an den diversen Varianten der *Mus musculus* nahm im Laufe des späten 19. und des frühen 20. Jahrhunderts auch der Handel unter den sogenannten „*mouse fanciers*“ (den Vorgängern der heutigen Züchter) zu. Aufgrund ihrer geringen Größe und der hohen Reproduktionsraten wurden Mäuse schon in frühen Zeiten der Wissenschaft als Versuchstier verwendet. Allerdings gab es in diesen Zeiten keine kommerziellen Züchter und Anbieter von Mäusen zu wissenschaftlichen Zwecken. Dies änderte sich zu Beginn des 20. Jahrhunderts, als Abbie Lathrop eine Mäusezucht in Granby, Massachusetts eröffnete. Ursprünglich sollten die Mäuse als Haustiere angeboten werden, Abbie Lathrop registrierte allerdings zunehmend, dass das Verkaufen der Tiere an Wissenschaftler lukrativer zu sein schien. So verkaufte Abbie Lathrop Mäuse an William E. Castle und seinen Studenten, C.C. Little vom Bussey Institute in Boston und Leo Loeb von der University of Pennsylvania. Der am häufigsten verwendete Inzuchtmausstamm der letzten 80 Jahre, die C57BL/6-Maus ist auf die Zucht von Abbie Lathrop zurück zu führen. Im 20. Jahrhundert wurden vor allem Inzuchtmausstämme in der Wissenschaft verwendet. Jedoch belegten Studien mit Wildfängen, dass es eine hohe Anzahl an natürlich auftretenden Polymorphismen gibt, die bei den Inzuchtmausstämmen nicht erfasst werden können. Zeitgleich wurden die Mendelschen Gesetze bekannt und so begann die gezielte Zucht, in erster Linie auf verschiedene Fellfarben, in zweiter Instanz auf eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Tumoren (Fox et al., 2007).

2.5 Die FVB/NJ-Maus

Der FVB/NJ-Mausstamm hat seinen Ursprung in einer Kolonie von Auszucht-Swiss-Mäusen, die 1966 am National Institute of Health selektiv auf eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Histamindiphosphat und dem namensgebenden B-Stamm des Friend-Leukämievirus gezüchtet wurden. Dies führte zur Etablierung des FVB/N-Inzuchtstamms, der anschließend in das Jackson Laboratory überführt und zukünftig als FVB/NJ bezeichnet wurde. Die albinotischen FVB/N-Mäuse zeichnen sich durch enormen Reproduktionserfolg und eine gleichbleibende hohe Anzahl abgesetzter Jungtiere aus. Der FVB/N-Inzuchtmausstamm ist durch die Vielzahl prominenter Pronuklei ideal für das Einbringen von genetischem Material durch Mikroinjektion und somit für die meisten transgenen Experimente und nachfolgenden genetischen Analysen geeignet (Taketo et al., 1991). In der Neurobiologie stellt dieser Stamm ein etabliertes Epilepsiemodell dar. Mäuse dieses Stammes sind empfänglich für Neurodegenerationen und daraus resultierende Anfälle, die mit Chemokonvulsiva wie Pilocarpin oder Kaininsäure induziert werden (Schauwecker, 2012). Während der Zucht und Betreuung von Mäusen dieses Stammes in der zentralen Tierhaltung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (DIfE) stellte sich heraus, dass einige Tiere stereotypes Verhalten aufwiesen.

2.6 Vorkommen stereotypen Verhaltens

Stereotypes Verhalten wird im Allgemeinen definiert als das abnormale und unangemessene Wiederholen von Verhaltens- und Bewegungsmustern, ohne Abweichungen in der Ausführung, welches funktionslos bzw. nicht zielführend für das Tier zu sein scheint (Mason, 1991). Bei Tieren, die in ihrem natürlichen Habitat leben, scheinen Stereotypen nicht vorzukommen. Dieser Annahme liegen zwei Theorien zu Grunde: (1) sie werden nicht beobachtet und deshalb wird davon ausgegangen, dass sie nicht vorkommen; (2) sie kommen zu einem geringen Teil vor, die Überlebensrate stereotyper Tiere ist allerdings sehr gering, sodass sie kaum beobachtet werden können (Mostard, 2011). Die Angaben zu Stereotypen bei Mäusen in der Versuchstierhaltung variieren beträchtlich, zudem gibt es starke stammspezifische und geschlechterabhängige Unterschiede (Bechard et al., 2012; Cabib and Bonaventura, 1997; Cash-Padgett et al., 2016; Ryan et al., 2010). Darüber hinaus gilt es bei zu Versuchszwecken gehaltenen Mäusen zu unterscheiden, ob es sich um Tiere aus der versuchstierkundlichen Zucht oder, wie z.T. bei den Afrikanischen Striemen-Grasmäusen üblich, um Wildfänge handelt. Denn die Herkunft des Tieres beeinflusst die spätere Entwicklung stereotypen Verhaltens. Wildfänge neigen weniger zu haltungsbedingten Stereotypen als Tiere, die bereits in Gefangenschaft aufgezogen werden. Hierbei spielt allerdings das Alter, in dem die Tiere aus dem natürlichen Lebensraum entnommen werden eine Rolle. Studien zeigen, dass Tiere, die bis zum Adultstadium in der Natur aufwachsen, relativ resistent gegen die Entwicklung stereotypen Verhaltens zu sein scheinen. Wohingegen Tiere, insbesondere Männchen, die noch juvenil künstlichen Haltungsbedingungen exponiert werden, in nahezu gleichem Maße Stereotypen entwickeln, wie Tiere, die unter diesen Haltungsbedingungen aufgewachsen sind (Jones et al., 2011). Die Prävalenz stereotypen Verhaltens ist also stark von der Spezies, dem Geschlecht, den Haltungsbedingungen und der Herkunft abhängig. Daher ist das Abschätzen der Gesamtzahl weltweit betroffener Tiere kaum möglich. Im Rahmen der Zucht und Betreuung von FVB/NJ-Mäusen in der zentralen Tierhaltung des DIfE konnte beobachtet werden, dass nicht alle Tiere eines Wurfes Stereotypen aufweisen. Jedoch sind die Zucht-, Aufzucht- und Haltungsbedingungen für alle Tiere absolut identisch und auch das genetische Profil der Tiere zeigt nahezu 100%ige Übereinstimmung.

2.7 Standardisierung der Haltungsbedingungen

Die Standardisierung ist ein zentrales Anliegen in der Versuchstierkunde. Neben der standardisierten Verwendung von Tieren (Inzucht- oder Auszuchtmauslinien), sollen vor allem die Haltungsbedingungen der Tiere maximal standardisiert werden, um unter Verwendung möglichst weniger Tiere eine maximale Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der zu erwartenden Ergebnisse zu gewährleisten. Dazu werden Richtlinien verfasst, die das Makroklima im Tierhaltungsraum regeln. Laut Empfehlungen der Gesellschaft für

Versuchstierkunde (GV-Solas) aus dem Jahr 2014 (Busch et al., 2014) soll die Standardhaltung der Maus in einem Raum mit 20-24 °C Temperatur, 45-65% relativer Luftfeuchtigkeit, 15-20-facher Luftwechselrate pro Stunde, einer Lichtintensität <200 Lux mit reduzierter Lärmbelastung erfolgen. Die Installation eines konsequenten Lichtregimes mit einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus beruht auf der Beobachtung, dass nahezu alle Organismen auf der Welt mit einer biologischen Uhr, die im 24-Stunden-Takt läuft, ausgestattet sind. Auch das Monitoring chemischer, physikalischer und mikrobieller Kontaminanten trägt, neben der Reduzierung des Allergie- und Zoonosepotentials für das Personal, zu einer Standardisierung der Haltungsumwelt bei. Darüber hinaus soll auch das Mikroklima im Käfig maximal einheitlich gestaltet werden. Dazu zählen Empfehlungen zur optimalen Besatzdichte, zum Typ und der Tiefe des Einstreumaterials, zum Nestmaterial und zu den Reinigungsroutinen. Hervorzuheben ist hierbei die Entwicklung der Käfigsysteme, in denen die Labornager gehalten werden. Während die ursprüngliche Haltungsform die sogenannten „offene Käfigen“ darstellen, werden sie im Rahmen der zunehmenden Standardisierung von technologisierten Systemen abgelöst. In den offenen Käfigen ist eine vokale, pheromonale und olfaktorische Kommunikation, wenn auch in Grenzen, möglich. Die Tiere haben demnach die Möglichkeit sich an bestimmte Geräusche und Haltungssituationen zu gewöhnen. Der Nachteil besteht allerdings darin, dass das Nichtvorhandensein eines Filtersystems die Transmission von aerogenen Infektionen und Allergenen begünstigt. Dem wurde durch die Integration eines Filters (*filter-top-cages*) entgegengewirkt. Dies führte allerdings zu einer erhöhten Luftfeuchte und einer gestiegenen Kohlendioxid- und Ammoniakkonzentration innerhalb des Käfigs. Das heutzutage hauptsächlich verwendete Haltungssystem sind die individuell-ventilierten Käfige (IVC). Hier wird das verminderte Infektions- und Allergierisiko mit einer optimierten Belüftung des Käfigs kombiniert. Jedoch zeigten BAUMANS et al., dass ein erhöhter Luftzug der automatischen Belüftungsanlage eine aversive Situation für die Tiere darstellt (Baumans et al., 2002). Zudem stellt der Käfig auch eine Art auditive und olfaktorische „Abschottung“ gegenüber der Umwelt dar. Was auf der einen Seite die Tiere vor Lärm aus dem Haltungsraum bewahrt, schränkt auf der anderen Seite die Kommunikation zwischen den Käfigen ein. Mit zunehmender Standardisierung der Haltungsbedingungen, wurde ein intensiveres Hygienemonitoring ermöglicht, die Verhaltensansprüche der Mäuse sind dabei jedoch in den Hintergrund gerückt. Das Verhalten eines jeden Individuums ist allerdings flexibel und kann sich an verändernde Umweltbedingungen anpassen. Eventuell haben sich so die Mäuse in versuchstierkundlichen Einrichtungen über die Jahre hinweg an die zunehmende Technisierung und die humanisierten Haltungsbedingungen angepasst.

2.8 Normalverhalten der Maus

Das Normalverhalten orientiert sich stets an dem Verhalten wie es bei der jeweiligen Spezies in freier Wildbahn vorkommt. Jede höher entwickelte Tierart verfügt über

arttypische Lautäußerungen, Bewegungen und Körperstellungen. Die Gesamtheit dieser Verhaltensweisen wird als Ethogramm bezeichnet. Die Hausmaus, *Mus musculus*, zeichnet sich durch eine hohe Anpassungsfähigkeit aus. Vergleichbar hohe Mutationsraten, die ein genetisches Anpassungsvermögen ausmachen und die starke Reproduktionsleistung ermöglichen es, sich schnell an verändernde Umweltbedingungen zu adaptieren. Die omnivoren Mäuse verbringen in ihrem natürlichen Habitat viel Zeit mit der Nahrungssuche und dem Suchen nach geeigneten Reproduktionspartnern. Die sensorische Welt der Mäuse wird vor allem durch den Riechsinn bestimmt. Sie nutzen Geruchsstoffe und Pheromone dafür, Futter zu erkennen, Prädatoren auszumachen, sich gegenseitig zu identifizieren sowie Aufschluss über den hormonellen und sozialen Status eines Artgenossen zu erlangen. Die Aufzucht von Jungtieren geschieht in vielen Fällen unter paternaler Beteiligung. Die Vatertiere helfen dem Muttertier dabei, die Nachkommen zu säubern, sie wieder ins Nest zu holen, wenn Gefahr droht und begleiten sie bei den ersten explorativen Ausflügen im Alter von drei bis vier Wochen. Das Alter, in dem die Jungtiere das Nest endgültig verlassen, variiert mit der Verfügbarkeit von Ressourcen. Mäuse in freier Wildbahn leben entweder allein (vor allem männliche Tiere) oder im Familienverband. Ihr Aktivitätshoch zeigen sie in der Morgendämmerung. Mäuse sind sehr agil, bewegen sich in kurzen, schnellen Bewegungsetappen fort, können gut klettern, springen und schwimmen. Die Territorien der Mäuseböcke erstrecken sich von einigen Quadratmetern bis hin zu mehreren Quadratkilometern, die es ermöglichen, sich fortzubewegen, zu klettern und zu graben. Sie vermeiden dabei Regionen mit geringer Vegetation. Den Hauptanteil der aktiven Zeit verbringen die Tiere mit dem Patrouillieren entlang der Grenzen ihres Territoriums, mit dem Identifizieren von Artgenossen, der Futtersuche und der Aufzucht von Jungtieren. Das physische und soziale Umfeld von Wildmäusen unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von den Bedingungen, in denen zu Versuchszwecken gehaltene Mäuse untergebracht werden (Kapitel 2.7). Diese künstlichen Haltungsbedingungen können dazu führen, dass Mäuse sogenannte Verhaltensabweichungen entwickeln (Latham et al., 2004). Gezeigtes Verhalten wird dann als Verhaltensabweichung (abnormales Verhalten) definiert, wenn es zu intensiv, zu häufig, zu lang oder in Abwesenheit eines adäquaten Stimulus auftritt (Sambraus, 1997). Jedoch muss ein Verhalten, das in dieser Hinsicht von einem geläufigen Mittelwert abweicht, nicht zwangsläufig pathologisch sein, es kann auch der Ausdruck einer Adaptation sein. Außerdem bedarf der Begriff „abnormal“ einer spezifischeren Definition. Abnormal kann auf der einen Seite „abweichend von der Norm“ bedeuten. Das bedeutet, abnormale Verhaltensweisen wären demzufolge statistisch selten und/oder abweichend von einer gewählten Population. Auf der anderen Seite kann das Adjektiv „abnormal“ auch mit „funktionslos“ gleichgesetzt werden oder bedeuten, aufgrund einer zugrundeliegenden Pathologie (dem Tier) zu schaden. Stereotypien können demzufolge für eine Population, die in Gefangenschaft lebt, durchaus „normal“ (=nicht statistisch selten) sein. Die Mehrheit der Autoren bezieht sich bei der Begriffsbestimmung

allerdings auf freilebende Tiere oder Tiere, die in naturnahen Haltungsbedingungen leben. Folgt man dieser Sichtweise, sind Stereotypen im Kontext und der Frequenz der Ausübung des Verhaltens tatsächlich „abnormal“ (Mason, 1991). Vielleicht sind Stereotypen aber auch als Ausdruck einer normalen Verhaltensanpassung zu verstehen.

2.9 Verhaltensanpassung

Ziel eines jeden Individuums ist es sich optimal an die herrschenden Umweltbedingungen anzupassen, um eine möglichst hohe biologische Fitness zu erreichen. Ausschlaggebend für den adaptiven Wert eines Merkmals sind dessen Auswirkungen auf die Anzahl der Nachkommen (viele Nachkommen = hohe biologische Fitness). Um diese zu maximieren, haben sich evolutionsbiologisch nicht nur die physischen und psychischen Eigenschaften von Tierarten herausgebildet, sondern auch deren tierartspezifisches Verhaltensrepertoire (Ethogramm). Die künstlichen Haltungsbedingungen, z.B. in der Versuchstierkunde, der Landwirtschaft, in Zoos und Zirkussen, stellen allerdings neue Herausforderungen dar, weichen von den evolutionär geformten „Umwelterwartungen“ ab und schöpfen darüber hinaus scheinbar die Möglichkeiten zur Adaptation aus (Düpjan and Puppe, 2016). Die Verhaltensanpassung geschieht dabei auf mehreren Ebenen der Entwicklung einer Spezies (Phylogenese), bzw. derer Individuen (Ontogenese). Der Evolutionsfaktor „Mutation“ trägt über spontane Veränderungen des Genoms zur Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen innerhalb einer Population und somit auch zu der Ausprägung verschiedener (adaptiver) Verhaltensweisen bei. Die Mutation kann demzufolge eine zufällige Verbesserung der Anpassung bewirken. Ob der Genpool (und die damit verbundene Verhaltensanpassung) nachhaltig verändert werden, hängt entscheidend davon ab, wie die Selektion auf die neue Merkmalsausprägung wirkt. Wobei selektierte Merkmale, die eine höhere biologische Fitness indizieren (einen höheren adaptiven Wert besitzen), dabei die Richtung vorgeben. Umgekehrt können bestimmte Verhaltensaspekte selbst Einfluss auf Evolutionsprozesse nehmen. Eine Änderung des Verhaltens kann zu einer Änderung der Selektionsbedingungen führen und somit neue evolutive Anpassungen bedingen. Selektierte Merkmale können genetisch bedingt sein oder es kann sich um umweltbedingte Varianten oder Modifikationen handeln. Als Modifikation bezeichnet LORENZ (Lorenz, 1978) „[...] jede andauernde Veränderung, die in einem Organismus während seines individuellen Lebens durch äußere Einwirkungen hervorgerufen wird“. Dient diese Modifikation nicht nur dem kurzzeitigen Erwerb von nicht im Genom verankerter Information, sondern führt zu einer dauerhaften Anpassung des Individuums, wird diese Modifikation „gespeichert“ und im Rahmen der Phylogenese weitergegeben. Eine reversible Verhaltensanpassung im Rahmen der Ontogenese kann durch Lernvorgänge geschehen. Lernen stellt die Auswahl jenes „Verhaltensprogramms“ dar, das auf die vorliegende Umweltsituation am besten passt. Jedem Lernvorgang liegt dabei ein phylogenetischer Mechanismus zugrunde, der angeborene Informationen enthält. Laut LORENZ stehen demnach die Phylogenese (u.a.

Mutation, Selektion) und die Adaptation des Verhaltens (u.a. Modifikation, Lernen) in unmittelbarer Beziehung zueinander, wobei beide Mechanismen nicht isoliert betrachtet werden können. Laut TEMBROCK (Tembrock, 1987) haben sich im Laufe der Evolution drei Wege der Verhaltensanpassung an bestimmte Umweltbedingungen herausgebildet: (1) Nutzung der Lokomotionsfähigkeit, um entsprechend den aktuellen Umweltansprüchen günstigere Umweltbedingungen aufzusuchen – in der Versuchstierhaltung für die Tiere nicht möglich; (2) Veränderung der Umwelt oder bestimmter Eigenschaften durch aktives Einwirken – für Tiere unter artifiziellen Haltungsbedingungen nur begrenzt möglich; (3) Nutzung des gegebenen Verhaltensrepertoires und dessen Anpassung an die vorherrschenden Umweltbedingungen durch Änderung im Geno- und/oder Phänotypus.

Laut FRASER et al. gibt es drei Möglichkeiten, weshalb Tiere ihre Umwelt nicht bewältigen können und daraus potentiell Probleme entstehen (Fraser et al., 1997): (1) Die im Verhaltensrepertoire verankerten, hoch motivierten Verhaltensweisen haben keine Funktion mehr. In der neuen Umgebung können so unangenehme subjektive Erfahrungen entstehen, ohne dabei die Biologie des Tieres an sich zu beeinträchtigen. So wird z.B. durch die in der Versuchstierkunde übliche *ad libitum* Fütterung der physiologische Nahrungsbedarf der Tiere gedeckt; die Nahrungssuche, die unter natürlichen Bedingungen viel Zeit in Anspruch nehmen würde, wird allerdings verdrängt. (2) Die artifizielle Umwelt stellt Herausforderungen an das Tier, die es nicht erfüllen kann. So kann z.B. die Gruppenhaltung von Mäuseböcken, ohne die Möglichkeit zur Schaffung von Territorien oder Rückzugsmöglichkeiten, zu erheblichen Auseinandersetzungen führen. (3) Das Tier reagiert mit einer gewissen Adaptation auf die Umwelt; die Anpassungsmöglichkeiten erweisen sich allerdings als unzureichend. Mäuse reagieren bei Haltungstemperaturen unterhalb der thermoneutralen Zone, neben anderen Adaptationsversuchen auch mit vermehrtem Nestbau, um eine eigene thermoneutrale Zone zu schaffen. Steht ihnen allerdings nicht genügend oder gar kein Nestmaterial zur Verfügung, ist die Anpassung an die Umwelt ungenügend (Gaskill et al., 2012). Können Tiere über einen längeren Zeitraum ihre Umwelt nicht bewältigen, kann es bei einigen Individuen zur Ausbildung von angepassten Verhaltensweisen, wie Stereotypen, kommen.

2.10 Entstehung stereotypen Verhaltens

Stereotypen entstehen laut WÜRBEL als eine Verhaltensantwort auf Frustration, Motivationskonflikte, Bewegungsdrang, Ersatzhandlungen oder aus umorientiertem Verhalten (Würbel, 2006). Deshalb kann das ursprüngliche Verhalten, aus dem die Stereotypie hervorgegangen ist, Auskunft über die zugrundeliegende Motivation geben. Allerdings erscheinen die Grenzen zwischen den Gründen, die zum Wiederholen des ursprünglichen Verhaltens (*source behaviour*) führen und dem Entwicklungsprozess, bei dem diese Wiederholungen der Verhaltensantworten zu stereotypem Verhalten werden,

fließend. Eine Motivationsgrundlage, die bereits in vielen Studien Bestätigung fand, ist der Versuch aus dem Käfig auszubrechen (*escape attempts*). Die möglichen Gründe, die zu den „Ausbruchsversuchen“ führen sind mannigfaltig. Sie reichen von einer Aversion gegen den eigentlichen Haltungskäfig, über die Maximierung der Reproduktionsmöglichkeiten und dem Drang nach Kontaktaufnahme zu den Mäusen aus dem Nachbarkäfig, bis hin zu der Suche nach Versteckmöglichkeiten und Futterressourcen. Aus mehreren Studien an Gerbilen weiß man, dass sie während der Haltung in einfachen Käfigen ohne Versteckmöglichkeit stereotypes Graben entwickeln. Dieses Graben geschieht vor allem in den Ecken des Käfigs und wird von der Käfiggröße nicht beeinflusst (Wiedenmayer and Brunner, 1992; Wiedenmayer et al., 1996). Bietet man Gerbilen den Zugang zu einem artifiziellen Tunnelsystem an, das einem Bewohnen von Erdhöhlen ähnelt, kann die Entwicklung des stereotypen Verhaltens verhindert werden. Der Zugang zu einer separaten Sandarena, wo das Graben an sich möglich ist, allerdings kein solides Gangsystem konstruiert werden kann, reicht nicht, um das stereotype Graben zu verhindern. Die Motivation für dieses Verhalten scheint in dem Fall also ebenfalls ein „Ausbruchsversuch“ zu sein, mit dem Ziel Schutz in einem stabilen Gangsystem zu finden (Wiedenmayer, 1997). Zahlreiche Studien belegen außerdem, dass das vehemente Benagen des Käfiggitters (*wire gnawing, bar-mouthing, bar-chewing*) den Versuch aus dem Käfig zu gelangen widerspiegelt (Nevison et al., 1999; Würbel et al., 2010). So zeigen CD1(ICR)-Mäuse eine klare Präferenz zu Gitterstäben, die an der Käfigwand angebracht sind, gegenüber Stäben, die sich innerhalb des Käfigs befinden. Diese Präferenz wird dadurch bestärkt, dass die Tiere nach ungefähr einer Woche „Lernzeit“ sich nahezu ausschließlich an die Gitterstäbe hängen, die einmal täglich geöffnet werden (Lewis and Hurst, 2004). Ein weiterer Grund für den Drang aus dem Käfig zu gelangen und den daraus resultierenden Stereotypen kann das abrupte Absetzen sein. In der Versuchstierkunde üblich ist das Absetzen von Mäusen in einem Alter von 21 Tagen. Hierbei werden die Jungtiere von einem Tag auf den anderen von dem Muttertier getrennt und danach in gleichgeschlechtlichen Gruppen gehalten oder, wenn der Versuchsaufbau es verlangt, in Einzelhaltung gesetzt. ICR-Mäuse, die bereits an Tag 17 abgesetzt wurden und Tiere mit sehr niedrigem Absatzgewicht zeigten vermehrt „Ausbruchsversuche“ (*escape-related behaviour*) und entwickelten höhere Stereotypie-Level (Würbel and Stauffacher, 1997). Die Annahme ist also, dass Tiere, die vorzeitig oder mit einem geringen Gewicht abgesetzt werden, eine herabgesetzte körperliche Fitness aufweisen und so der Drang zur laktierenden Mutter zu gelangen, erhöht ist. Diese Ergebnisse können allerdings nicht in allen Studien bestätigt werden. Das Ausüben stereotypen Verhaltens ist ein energieintensiver Prozess. Dass ICR-Mäuse mit einem geringeren Gewicht auch die geringeren Stereotypie-Level aufweisen kann auch damit begründet werden, dass Tiere mit einer herabgesetzten körperlichen Verfassung angehalten sind ihre Energie „zu sparen“ (Nevison et al., 1999). Zusätzlich gibt es auch Daten, die belegen, dass weder das

Absatzalter noch das Absatzgewicht, sondern vielmehr die Wurfgröße einen Einfluss auf die spätere Entwicklung von Stereotypen bei weiblichen Mäusen hat (Bechard et al., 2012). Darüber hinaus prägen frühe soziale Erfahrungen in hohem Maße die Entwicklung von Stereotypen. Mäuse, die wie bei Wildmäusen üblich, biparental aufgezogen wurden (das heißt von Mutter- und Vatertier gleichzeitig) zeigen im Verlauf seltener stereotypes Verhalten (Jones et al., 2010a).

Stereotypen werden in den meisten Fällen nicht plötzlich entwickelt, die Entstehung gleicht eher einem Prozess (Wiedenmayer, 1997). Zu Beginn nehmen die Frequenz und die Dauer eines bestimmten Verhaltens zu. So ist z.B. das Grabeverhalten bei Mongolischen Wüstenrennmäusen, die in Käfigen ohne Nestbox gehalten werden und im Verlauf des Lebens zu einer erhöhten Prävalenz von Stereotypen neigen, bereits vom 24.-28. Lebensstag verstärkt ausgebildet (Schmooch, 2004). In einem weiteren Schritt ändert sich die Qualität der Stereotypen; mit der Zeit werden sie zunehmend invariabler. Mäuse, die mit zunehmendem Alter die Stereotypie des „*wire gnawing*“ (vehementes Benagen des Käfiggitters) entwickelt haben, sind vor dem Einsetzen des eigentlichen stereotypen Verhaltens bereits vermehrt geklettert, wobei sie anfangs scheinbar zufällig zeitgleich geschnüffelt und gelegentlich am Käfiggitter genagt haben und sich daraus das typische Verhaltensmuster entwickelt hat (Würbel et al., 2010). In der sich anschließenden Emanzipationsphase wird das Verhalten vermehrt unabhängig vom Auslöser gezeigt und verliert an Variabilität. Die nächste Stufe ist das *establishment* oder die Perseveration. Hier wird das stereotype Verhalten auch in Situationen gezeigt, in denen es normalerweise nicht entstehen würde.

Stereotypen werden oft als „Selbstverstärker“ beschrieben. Effekte, die mit der Ausübung eines Verhaltens assoziiert sind, verstärken es wiederum und führen zu einer vehementen Wiederholung. Somit werden Stereotypen von verschiedenen Autoren auch stressreduzierende Effekte aufgrund der selbstbelohnenden Eigenschaften zugesprochen. So entstand auch der Begriff der „Coping-Hypothese“. Coping bezieht sich hier auf eine erlernte Verhaltensantwort, die zumindest in den meisten Fällen Vorteile für das Individuum bringt und relativ spezifisch in Bezug auf die Ursache oder den Effekt ist (Würbel, 2006). Tiere, die in künstlichen Lebensräumen untergebracht sind, werden mit einer Vielzahl von potenziellen Stressoren konfrontiert. Die Standardhaltungsbedingungen, die in der Versuchstierkunde üblich sind, bedeuten eine Exposition zu artifiziellem Licht, lauten Geräuschen, potentiell unangenehmen Gerüchen, unkomfortablen Temperaturen bei limitiertem Platzangebot, eingeschränkten Bewegungsmöglichkeiten, gezwungener Nähe zu Menschen und Haltung in abnormalen sozialen Gruppen. Soziale Tiere isoliert und in einer wenig strukturierten, kargen Haltungsumgebung unterzubringen, kann chronischen Stress bedeuten (Schoenecker et al., 2000). Stereotypen werden als eine

Möglichkeit zur Anpassung an diese aversiven Umstände diskutiert. Eine Möglichkeit besteht darin, durch die Ausübung stereotypen Verhaltens den eigenen Stress-Level zu senken, indem die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (HPA) herabgesetzt wird und so weniger Cortisol (CSL) und Corticosteron (CST) ausgeschüttet werden. Die Coping-Hypothese wird, nicht zuletzt wegen der inkongruenten Datenlage, weiterhin kontrovers diskutiert. Es bleibt also unklar, ob stereotypes Verhalten Tieren hilft, bestimmte Situationen zu bewältigen. Festzuhalten bleibt allerdings, dass zumindest einige Stereotypen in einigen Spezies, vorteilhaft zu sein scheinen. Wobei ungeklärt ist, ob die (coping) Effekte fundamentale Gründe für die Entstehung und Ausübung stereotypen Verhaltens sind oder angenehme Nebeneffekte darstellen.

2.11 Prävention stereotypen Verhaltens

Maßnahmen, die zum Inhibieren von Stereotypen diskutiert werden, lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Zu der ersten Kategorie zählen Interventionen, die der Symptombekämpfung dienen ohne den Auslöser zu identifizieren oder der Ursache entgegen zu wirken. Beobachtungen bei Rötelmäusen, die durch Absenkung der Käfigoberseite vom stereotypen Springen abgehalten wurden, zeigten dass bei Tieren mit höheren Stereotypie-Levels auch eine stärkere und andauerndere Erhöhung der Plasma CST Werte im Vergleich zu den weniger stereotypen Tieren (Kennes and de Rycke, 1988) festzustellen war. Bei Mäusen, die durch die Verringerung der Abstände zwischen den Gitterstäben, davon abgehalten wurden, das stereotype *Wire gnawing* auszuüben, erhöhten sich initial die CST Levels und die Tiere verhielten sich vermehrt inaktiv bis sie abweichende Verhaltensgewohnheiten entwickelt hatten. An Tag drei nach der „Inhibition“ glichen sich die CST Levels wiederum den Basalwerten an (Würbel et al., 1998; Würbel and Stauffacher, 1996). Hiermit ließ sich feststellen, dass Stereotypen nicht unweigerlich zur chronischen Stressreduktion beitragen. Durch das Abhalten vom Ausüben stereotypen Verhaltens werden jedoch Verhaltensroutinen durchbrochen, die zumindest zu einer kurzzeitigen Erhöhung des Stresslevels führen.

Zur zweiten Kategorie von Möglichkeiten Stereotypen zu verhindern, gehören präventive Maßnahmen, die bereits die Ursache bekämpfen und so die Entwicklung stereotypen Verhaltens idealerweise vermeiden. Hierzu zählen z.B. Aspekte, die während der Aufzucht beachtet werden sollten und die Strukturierung der Haltungsumwelt. Nagetiere in Versuchstierhaltungen werden oft in Käfigen gehalten, die in Bezug auf das vorherrschende Platzangebot und die angebotene Komplexität wesentlichen Besonderheiten ihres natürlichen Habitats nicht entsprechen. Die Standardhaltungsbedingungen bedeuten somit Einschränkungen für das Ausleben des speziesspezifischen Verhaltens und führen zu einer möglichen adäquaten Anpassung an diese Haltungsbedingungen (z.B. Veränderungen in der Gehirnentwicklung und den daraus resultierenden neurologischen Konsequenzen). Die

Eignung von Tieren, die unter diesen Bedingungen gehalten werden, ist demnach laut WÜRBEL für die Forschung (insbesondere die Verhaltensneurologie) in Frage zu stellen (Würbel, 2001). Die Hausmaus *Mus musculus*, von der die heutigen Labormäuse ursprünglich abstammen, ist für ihre hohe Adaptationsfähigkeit bekannt. Dies ermöglicht es ihr dem Menschen (und damit möglichen essentiellen Ressourcen) auch in variierenden Lebensräumen zu folgen (Latham et al., 2004). Tiere dieser Spezies in reizarmen, wenig strukturierten Käfigen zu halten, beeinträchtigt nicht nur deren Wohlbefinden, sondern trägt laut diversen Untersuchungen auch zu einer reduzierten Reproduzierbarkeit von Versuchen bei (Richter et al., 2009; Wolfer et al., 2004). Das „*Environmental Enrichment*“ ist scheinbar die potenteste Methode, um auf der einen Seite stereotypes Verhalten vorzubeugen und auf der anderen Seite das Wohlergehen der Tiere zu maximieren (Daigle et al., 2014; Mason et al., 2007). Als Käfiganreicherung werden alle Veränderungen der Haltungsbedingungen bezeichnet, die die Frequenz und die Vielfalt natürlicher Verhaltensweisen steigern, das Auftreten abnormalen Verhaltens minimieren und die Fähigkeit Herausforderungen zu bewältigen, die die artifizielle Umgebung mit sich bringt, maximieren (Leach et al., 2000). Dabei sollte sich die Gestaltung des Käfigs stets an den natürlichen Bedingungen, in denen die jeweilige Spezies lebt, orientieren. Für eine normale Gehirn- und Verhaltensentwicklung steht dabei eher das optimale als das maximale *Enrichment* im Vordergrund (van Praag et al., 2000). Eine der potentiell wertvollsten Ressourcen für Mäuse ist das geeignete Nestmaterial (Olsson and Dahlborn, 2002). Mäuse, die in einem Versuch entweder nur Nestmaterial (Baumwolle) oder zusätzlich noch Kletter- und Versteckmöglichkeiten angeboten bekommen (die sich in einer Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum nicht ändern und in der anderen Gruppe neun verschiedene Kombinationen zusammengestellt werden), zeigen deutlich gesunkene Stereotypie-Levels im Gegensatz zu Tieren desselben Stammes, die ohne Käfiganreicherung gehalten werden. Allerdings lässt sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Enrichment-Regimen an sich auf die Entwicklung von Stereotypen und Angst-assoziiertem Verhalten feststellen (Gross et al., 2011). Entscheidend ist dabei außerdem, in welcher Lebensphase ein Tier mit der Käfiganreicherung konfrontiert wird. Das sogenannte „*early enrichment*“, also die Haltung in ausgestalteten Käfig bereits in sehr jungem Alter kann zu einer deutlichen Absenkung der Stereotypie-Prävalenzen führen, welche selbst dann beibehalten werden kann, wenn die Tiere in späteren Lebensphasen in karge Käfige überführt werden (Cooper et al., 1996a; Jones et al., 2011; Powell et al., 2000). Daten, dass die Käfiganreicherung bei Mäusen im Alter von wenigen Wochen, sechs Monaten und elf Monaten die Stereotypie-Levels gleichermaßen effektiv herabgesenkt hat, weisen darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt die Stereotypen noch nicht vollständig entwickelt und emanzipiert waren (Gross et al., 2011; Gross et al., 2012). Je älter ein Tier wird und je etablierter das stereotype Verhalten ist, desto schwieriger scheint es zu sein, dieses Verhalten zu durchbrechen und

desto geringer wird die Motivation des Tieres Zugang zu einem ausgestalteten Käfig zu erlangen (Tilly et al., 2010).

Zur zweiten Kategorie gehört ebenfalls die pharmakologische Behandlung abnormal repetitiven Verhaltens. Besonders erwiesen haben sich hier Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, wie Fluoxetin und trizyklische Antidepressiva, wie Clomipramin (Mills and Luescher, 2006). Eine Zwischenstellung zum Verhindern stereotypen Verhaltens nimmt die Elimination durch gezielte Zucht ein, wobei die genetische Komponente bei der Entwicklung von Stereotypen nicht abschließend geklärt ist. Bei Rötelmäusen und Afrikanischen Striemen-Grasmäusen scheint der genetische Einfluss auf die Entwicklung stereotypen Verhaltens in Tochtergeneration gegeben zu sein. Hier war der Nachwuchs stereotyper Elterntiere drei bis sieben Mal häufiger ebenfalls stereotyp. Diese Ergebnisse wurden mit *cross-fostering* Versuchen bestätigt. Wobei sich zusätzlich ein stärkerer maternaler als paternaler Beitrag zur genetischen Transmission stereotypen Verhaltens herausstellte. Die Frage, inwieweit auch die Form des stereotypen Verhaltens weitergegeben wird, ergab unterschiedliche Erkenntnisse (Jones et al., 2008; Schoenecker and Heller, 2000; Schwaibold et al., 2001). Auch wenn stereotype Tiere z.T. eine gesteigerte Reproduktionsleistung aufweisen (Jones et al., 2010b), gestaltet sich die Zucht oft schwierig und diverse Zuchtparameter scheinen stark spezies- und stammabhängig zu sein. Dem abnormalen Verhalten durch gezielte Zucht entgegenzuwirken, erweist sich zusammenfassend als ethisch diskussionswürdig. Verhaltensabweichungen weisen, zumindest in manchen Fällen, auf Missstände der Haltungsbedingungen und die damit verbundenen Einschränkungen in der Expression speziesspezifischen Verhaltens hin. Diese Anzeichen züchterisch zu eliminieren, würde die Gefahr mit sich bringen, Tiere zu kreieren, die widerstandsfähig und robust sind, dementsprechend potentiell eingeschränktes Wohlbefinden nicht mehr durch Verhaltensanzeichen kenntlich machen.

2.12 Individualität und Animal Personality

Die Haltungsbedingungen, die bei einigen FBN/NJ-Mäusen zur Ausbildung stereotypen Verhaltens führen und bei anderen nicht, sind für alle Tiere identisch. Demzufolge müsste auch die, für die Entwicklung stereotypen Verhaltens als ursächlich beschriebene, Limitierung des speziesspezifischen Verhaltens für alle Individuen unter diesen Bedingungen gleich sein. Dazu kommt, dass es sich bei den Tieren des FVB/NJ-Mausstamms um Geschwistertiere eines Inzuchtmausstammes mit nahezu 100%iger genetischer Übereinstimmung handelt. Unklar bleibt, warum manche Tiere unter diesen Umständen Stereotypen entwickeln und andere nicht. Eine Erklärung dessen könnte das evolutionsbiologisch begründete Streben nach Individualität sein. Die phänotypische Variabilität beschreibt in der Biologie die Unterschiedlichkeit der Individuen einer Art.

Hintergrund dessen bildet die genetische Variabilität. Sie ist die Voraussetzung für die Evolution einer Art, indem sie durch neue Kombinationen genetischer Anlagen eine optimale Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen ermöglicht. Damit einhergehend, entwickeln sich zwischen den Individuen einer Art fortwährend divergierende somatische (körperliche), morphologische (anatomische), physiologische und biochemisch-immunologische Eigenschaften, als Ausdruck einer Individualität heraus. Der Erhalt der Individualität innerhalb einer Spezies bildet die Grundlage für die genetische Abgrenzung der Individuen voneinander und stellt so die Voraussetzung für die Evolution neuer Spezies dar (Wrede, 2013). Außerdem haben Erkenntnisse aus der Forschung zur Persönlichkeit von Tieren gezeigt, dass es Unterschiede im Verhalten und in der Plastizität des Verhaltens in Bezug auf die Umweltbedingungen/-änderungen gibt. Der Begriff der Persönlichkeit von Tieren (*Animal Personality*) beschreibt stabile individuelle Verhaltensunterschiede, die zwischen den Individuen einer Population variieren und innerhalb der Individuen zeitlich beständig ausgeprägt sind. Unterschieden wird dabei ein Verhaltenstyp (*behavioural type*) als Merkmal eines Individuums, das die zeit- und kontextunabhängige Beständigkeit des Verhaltens innerhalb eines Individuums beschreibt und Verhaltenssyndrome (*behavioural syndromes*), welche als Merkmal einer Population verstanden werden und die Konstanz des Verhaltens zwischen Individuen innerhalb einer Population beschreiben. Laut REALE werden die Begriffe Persönlichkeit, Temperament und Individualität häufig simultan verwendet und beziehen sich auf die fünf Hauptmerkmale des individuellen Verhaltens: Aktivität, Mut / Scheu (*boldness / shyness*; Verhaltensantwort auf potentiell bedrohliche Situationen), Exploration (Verhaltensantwort auf unbekannte Situationen), Aggressivität und Soziabilität (Réale et al., 2007). Obwohl *per definitionem* die individuellen Unterschiede im Verhalten über verschiedene Zeitpunkte hinweg konstant bleiben, bedeutet das nicht, dass sie festgesetzt sind. Das heißt, Verhaltensmerkmale sind plastisch und passen sich in gewissem Maße an die aktuelle Situation an. Die Heterogenität der Umweltbedingungen erfordert evolutionsbiologisch bedingt eher eine Verhaltensplastizität als eine Verhaltensbeständigkeit. Die definierte zeitliche Konstanz eines Verhaltenstyps bedeutet, dass das Verhalten eines Individuums in einer bestimmten Situation bzw. einem bestimmten Kontext zuverlässig von dem Verhalten anderer Individuen derselben Population abweicht. Beispielsweise errichten viele Spezies (Population) ihre Habitate eher in Gebieten, die wenigen Prädatoren ausgesetzt sind (*behavioural syndrome*). Eher mutige Individuen dieser Population (*behavioural type*) zeigen diese Verhaltensweise im Errichten ihres Habitats eher weniger. Studien von HERDE und ECCARD an Wildmäusen haben allerdings gezeigt, dass diese Verhaltensunterschiede zwar über kurze Zeitspannen hinweg stabil sind, sie sich aber über verschiedene Lebensphasen hinweg (unreif vs. hormonelle Reife) flexibel gestalten (Herde and Eccard, 2013). Zudem stellte sich heraus, dass es im Rahmen des *behavioural syndromes* Zusammenhänge zwischen Verhaltensmerkmalen gibt, die mit der Korrelation wichtiger

Etappen des Lebenszyklus' einhergehen. So führen individuelle Unterschiede in der Aktivität, Mut und Aggressivität zu Unterschieden im Wachstum, der Fruchtbarkeit und der Reproduktion (Biro et al., 2008). Dem Konzept der *Animal Personality* folgend, sollten auch das Auftreten und die Häufigkeit (und vielleicht sogar die Ausprägung) von Stereotypen unter bestimmten Haltungsbedingungen vorhersagbar zwischen Individuen variieren. Die Entwicklung stereotypen Verhaltens kann Ausdruck einer individuell divergierenden Adaptation an (potentiell aversive) Umweltbedingungen sein und die damit einhergehende gesteigerte physische Aktivität wiederum zu der Ausbildung eines gewissen metabolischen Phänotyps mit potentiell gesteigerter immunologischer Kompetenz beitragen. Bisher ist nicht geklärt, inwiefern und in welchem Ausmaß das Ausüben stereotypen Verhaltens den Metabolismus eines Tieres beeinflusst und wie sich die Auswirkungen der erhöhten Aktivität auf das Immunsystem der Tiere darstellen. Ein Marker biologischer Fitness ist die Kapazität des Immunsystems eines Individuums. Gesteigerte physische Aktivität korreliert mit einem intakten Immunsystem, wobei ein intaktes Immunsystem gleichzeitig die Voraussetzung für physische Aktivität darstellt. Folglich korrelieren Änderungen im Verhalten, die mit gesteigerter physischer Aktivität einhergehen, gleichzeitig mit der Leistungsfähigkeit des Immunsystems. Eine spezifische Verhaltensweise kann sich dann als evolutionär erfolgreich durchsetzen, wenn diese dem Individuum persönliche Vorteile bringt und in einer Sicherung von Nachkommen resultiert. Dieser Ansatz folgt damit der sogenannten „Pace-of-life syndrome“- Hypothese, die besagt, dass diese Zusammenhänge durch Koevolution als Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen entstanden sind (Réale, 2010). So bedingt z.B. eine gesteigerte Aggressivität den Erwerb essentieller Ressourcen, was potentiell mit der Koevolution hoher Wachstumsraten einhergeht. Allerdings erhöht Aggressivität wiederum die Mortalität und führt so zu einer Selektion auf frühe sexuelle Reife und intensive Reproduktion in frühen Lebensphasen (Biro et al., 2008). Nach dieser Hypothese wäre eine Kovarianz zwischen stabilen individuellen Unterschieden im Verhalten (z.B. Aktivität), der Kapazität des Immunsystems und des Metabolismus zu erwarten.

3 Zielsetzung

Um einen Beitrag zum Refinement von zu Versuchszwecken gehaltenen Tieren zu leisten, muss grundlegend das Verhalten der betreffenden Tiere verstanden werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll deshalb das stereotype Verhalten von FVB/NJ-Mäusen, exemplarisch für stereotype Mauslinien, erstmals detailliert charakterisiert werden und das so erlangte Verständnis über die Entwicklung und die Konsequenzen stereotypen Verhaltens systematisch zusammengetragen werden und zur Klärung folgender Hypothesen beitragen:

1. Das Auftreten von Stereotypen variiert zwischen Individuen und ist Ausdruck von unterschiedlichen Persönlichkeitstypen.
2. Das Verhalten korreliert mit einem metabolischen Phänotyp und trägt darüber zur Entwicklung der Individualität eines Lebewesens bei.
3. Die beobachteten Stereotypen bei FVB/NJ-Mäusen kovariieren mit einem proaktiven Persönlichkeitstyp (gesteigerter Aktivität= Fitness), proximat bedingt durch eine günstigere metabolische Stoffwechsellage.
4. Nicht alle Stereotypen sind als Ausdruck des Leidens zu verstehen.
5. Die Verwendung stereotyper Tiere in metabolisch-orientierten Studien beeinflusst die Validität der Ergebnisse.

4 Eigene Untersuchungen

4.1 Tierversuch

Der Tierversuch und die damit verbundenen Eingriffe wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz, Verbraucherschutz und Gesundheit Brandenburg geprüft und unter der Tierversuchsnummer G 2347-43-2014 genehmigt. Alle Eingriffe wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes und der Tierschutzversuchstier-Verordnung durchgeführt. Die Mäuse wurden entsprechend ausgearbeiteter Richtlinien der FELASA (www.felasa.eu/guidelines.php) und der nationalen Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS (www.gv-solas.de/index.html) untergebracht und behandelt.

4.1.1 Tiere und Tierhaltung

Die Mäuse stammen aus der hausinternen Zucht der Zentralen Versuchstierhaltung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (DIfE), Max-Rubner-Laboratorium (MRL), Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Nuthetal. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen (spezifiziert pathogenfrei) gezüchtet und aufgezogen. Ab Versuchsbeginn erfolgte die Haltung der Mäuse in individuell ventilierten Käfigen (IVC) mit den Innenmaßen 16 x 30,5 x 13 cm (B x L x H), die als offene Käfige genutzt wurden. Riech- und Sichtkontakt war demzufolge stets gewährleistet. Es wurden standardisierte Haltungsbedingungen, wie in Tabelle 4-1 aufgelistet, mit einem circadianem Tag-/Nachtrhythmus mit je einer halben Stunde Dämmerungsphase, eingehalten. Die Käfige waren mit Espenholzschnitzeln als Einstreumaterial und Papierhandtüchern und Baumwoll-Nestlets als Nistmaterial ausgestattet. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser. Alle Mäuse wurden täglich visitiert und der Verbrauch von Futter und Wasser regelmäßig kontrolliert.

Tabelle 4-1: Standardhaltungsbedingungen der Versuchstiere dieser Studie.

Hell-Dunkel-Rhythmus	12:12 Stunden (06.00-18.00 Uhr)
Raumtemperatur	22 ± 0,5 °C
Relative Luftfeuchte	50 ± 10 %
Raumgröße	18,9 m ²

4.2 Studiendesign

Der Versuch begann mit der Verpaarung der Parentalgeneration und der Erfassung diverser Zuchtparameter. Wie in Abb. 4-1 dargestellt, startete mit der Geburt von Jungtieren in der F₁-Generation die Beobachtung der Parentalgeneration, in der das maternale Verhalten erfasst wurde. Vom Absetzen an, über einen Zeitraum von 11 Wochen, wurden anschließend die Tiere der F₁-Generation kontinuierlich beobachtet, bis zum Versuchsende wöchentlich Kotproben gesammelt und das Körpergewicht bestimmt. Zusätzlich erfolgten begleitende Untersuchungen, wie Blutentnahmen (BE), die nicht-invasive Messung der Körperzusammensetzung mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Verhaltenstests (Open Field) und die Erfassung der Futter- und Wasseraufnahme und der Bewegungsaktivität im Käfig der Indirekten Tierkalorimetrie (ITK) für jeweils 24 Stunden über den Zeitraum einer Woche.

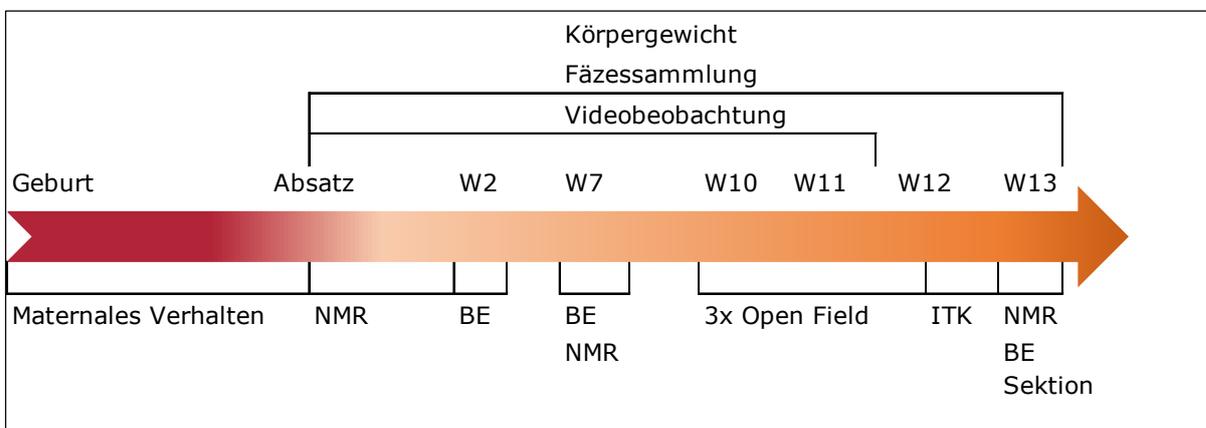


Abb. 4-1: Studiendesign dargestellt als zeitlicher Verlauf. (NMR= Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; BE= Blutentnahme; ITK= indirekte Kalorimetrie; W2 (...13) = Versuchswoche 2 (...13)).

4.2.1 Parentalgeneration

Zehn weibliche FVB/NJ-Mäuse (4 nicht-stereotype, 6 stereotype) wurden 2:1 (2 Weibchen, 1 Bock) mit nicht-stereotypen Männchen verpaart. Die Zucht wurde mittels täglicher Plaque Kontrolle und Körpergewichtserfassung überwacht. Da die väterliche Fürsorge nicht explizit analysiert werden sollte und um unvorhergesehene Einflüsse durch biparentale Aufzucht zu vermeiden, wurden die Weibchen bei den ersten Anzeichen einer Trächtigkeit separiert. Durch Erfahrungen in der Zucht von FVB/NJ-Mäusen im MRL war bekannt, dass – insbesondere bei stereotypen Muttertieren – oft hohe Aufzuchtverluste zu verzeichnen sind, daher wurden die Zuchtkäfige und die Käfige zur Beobachtung des maternalen Verhaltens zusätzlich mit Papphäusern ausgestattet. Es wurde vermutet, dass die Muttertiere ihre Nachkommen durch die Ausübung stereotypen Verhaltens physisch traktieren, sozusagen „überrennen“, die Papphäuser sollten hier einen Schutz darstellen.

4.2.2 Nachzucht

Die Würfe wurden am 22. Lebenstag abgesetzt. Zuchtparameter, wie die Wurfgröße, Geschlechterproportionen und Aufzuchtverluste wurden dokumentiert. 35 FVB/NJ-Mäuse (19 weiblich, 16 männlich) der F₁-Generation bildeten die Versuchstiere für den folgenden Verlauf der Studie. Für die detaillierte Beurteilung des Nachzuchtverhaltens wurden diese Tiere vom Absatz bis zum Ende des Versuchs einzeln gehalten. Die Einteilung der Tiere zu den entsprechenden Gruppen (stereotyp = ST; nicht-stereotyp = nST) erfolgte im Laufe des Versuchs, abhängig davon ob stereotypes Verhalten gezeigt wurde oder ausblieb. So ergaben sich die in Tabelle 4-2 dargestellten Versuchsgruppen:

Tabelle 4-2: Gruppeneinteilung.

Versuchsgruppe	gesamt	weiblich	männlich
nicht-stereotyp (nST)	16	7 (44%)	9 (56%)
stereotyp (ST)	19	12 (63%)	7 (37%)

4.3 In vivo Methoden

4.3.1 Videoüberwachung

Die Erfassung des maternalen Verhaltens und des Nachzuchtverhaltens erfolgte unter Verwendung Infrarot-empfindlicher Kameras. Wie in Abb. 4-2 zu erkennen ist, gab es vier offene Haltungsregale mit je drei Einlegeböden, von denen jeweils zwei Regale hintereinander standen. In jedem der beiden Regalsysteme befanden sich in einem Regal die Käfige, während auf dem anderen Regal dahinter (senkrecht zur Längsachse des Käfigs) die Kameras positioniert waren. In jeder Regalebene standen nebeneinander drei Käfige, respektive drei Kameras. Mit der Kamera-spezifischen Software wurden Videoaufzeichnungen angefertigt und auf einer externen Festplatte gespeichert, anhand derer die Auswertung erfolgte. Die Beobachtung der Tiere der F₁-Generation (n=35) erfolgte in zwei Etappen, sodass 18 Kameraplätze ausreichten.



Abb. 4-2: Regalsystem und Kameraplatzierung zur videogestützten Beobachtung der Tiere.

4.3.2 Maternales Verhalten

Die Beobachtung des mütterlichen Verhaltens erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen nach der Geburt von Jungtieren. Die Verhaltensbeobachtungen wurden in den in Abb. 4-3 dargestellten drei 7-Tage-Intervallen durchgeführt. Zu der jeweiligen Uhrzeit wurde das Verhalten für je 30 Minuten erfasst und innerhalb der 30 Minuten alle drei Minuten ausgewertet (Beispiel: 0.00, 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15, 0.18, 0.21, 0.24, 0.27, 0.30 Uhr). Sodass das Verhalten jedes Muttertiers über den gesamten Versuchszeitraum 1155 Mal detektiert wurde.

Intervall 1:	0.00 Uhr	6.00 Uhr	10.00 Uhr	14.00 Uhr	18.00 Uhr
Intervall 2:	1.00 Uhr	7.00 Uhr	11.00 Uhr	15.00 Uhr	19.00 Uhr
Intervall 3:	2.00 Uhr	8.00 Uhr	12.00 Uhr	16.00 Uhr	20.00 Uhr
<p>= 5 x 30 min / Tag</p> <p>Verhalten alle 3 Minuten erfasst: = 11 Beobachtungen / 30 min</p> <p>5 x 30 min á 11 Beobachtungen = 55 Beobachtungen / Tier / Tag</p> <p>5 x 30 min á 11 Beobachtungen über 21 Tage = 1155 Beobachtungen / Tier / Versuch</p>					

Abb. 4-3: Auflistung der Beobachtungsintervalle und der Gesamtbeobachtungen pro Muttertier während der Erfassung des maternalen Verhaltens.

Zur detaillierten Erfassung des maternalen und des nicht-mütterlichen Verhaltens wurde ein, in Tabelle 4-3 gezeigtes, eigens entwickeltes Protokoll verwendet. Die Beurteilung des maternalen Verhaltens erfolgte hierbei in Übereinstimmung mit den Methoden von MYERS (Myers et al., 1989) und CHAMPAGNE (Champagne et al., 2003). Um das nicht-mütterliche Verhalten zu evaluieren, basierte das Protokoll auf dem Maus-Ethogramm der Stanford School of Medicine (<http://mousebehavior.org/>). Erfasst wurde hierbei auch, wo sich das Muttertier innerhalb des Käfigs aufhielt; im Nest oder außerhalb des Nests und ob das Muttertier Kontakt zu seinen Jungen hatte oder nicht. Im Falle einer direkten Interaktion mit den Nachkommen, wurde unterschieden ob das Muttertier ein Junges geputzt oder gepflegt (*grooming pup*), getragen (*carrying pup*) oder gesäugt hat. Hierbei wurden zusätzlich die verschiedenen Positionen zum Säugen (*nursing posture*) differenziert. Die *arched-back nursing posture* stellt die intensivste und gleichzeitig die für das Muttertier

anstrengendste Form des Säugens dar (Caldji et al., 1998). Die Mutter positioniert sich hierbei wie ein Schutzschild über den Wurf, ihre Gliedmaßen vom Körper gespreizt und den Rücken in Form eines Bogens dorsal-konvex gebogen. Bei der *blanket* Säugeposition liegt das Tier auf der Seite während die Jungen gesäugt werden. Während des *passiven* Säugens zeigt das Muttertier gleichzeitig anderes Verhalten, wie z.B. fressen oder Nestbauverhalten. Das Säugen erfolgt in dem Moment eher zufällig, passiv und unter der Anstrengung der Jungen, weniger der Mutter. Für die weiteren Darstellungen und die Auswertung wurden diese Verhaltensweisen unter jeglichen Interaktionen mit den Nachkommen zusammengefasst (*interaction with pups*). Bei den nicht-mütterlichen Verhaltensweisen wurde unterschieden ob das Muttertier gerade Nestbauverhalten (*manipulating nest shavings*) gezeigt hat, es sich erholt bzw. geschlafen (*resting*) oder sich geputzt (*self-grooming*) hat. Beim *resting* wurde jedes Verhalten detektiert, bei dem sich das Muttertier vom Wurf separiert hat, um sich auszuruhen. Zumeist legte es sich hierbei flach auf den Boden, entweder mit offenen oder geschlossenen Augen. Außerdem wurde aufgezeichnet ob das Tier gefressen (*eating*) oder an Einstreumaterial oder Kotpellets geknabbert (*gnawing*) hat. Für die Analysen als „anderes Verhalten“ (*other*) zusammengefasst wurde: ob das Tier getrunken (*drinking*), sich auf den Hinterbeinen aufgestellt (*rearing*), geschnüffelt (*sniffing*) oder in der Einstreu gegraben (*digging*) hat, an der Futterraufe oder dem Käfiggitter geklettert (*climbing*) oder gelaufen (*walking*) ist oder ob es im Moment der Beobachtung den Käfig oder die Umgebung erkundet (*scanning*), uriniert (*urination*) oder defäkiert (*defecation*) hat. Außerdem wurde erfasst ob es Zeit mit stereotypem Verhalten (*stereotypy*) verbracht hat.

Tabelle 4-3: Protokoll zur detaillierten Erfassung des maternalen Verhaltens während der ersten 21 Tage post partum.

Location of mother	in nest		
	out of nest		
Maternal behaviour	contact with pup		<i>interaction with pups</i>
	no contact with pup		
	<i>grooming pup</i>		
	<i>carrying pup</i>		
Nursing posture	<i>arched nursing</i>		
	<i>blanket nursing</i>		
	<i>passive nursing</i>		
Non-maternal behaviour	manipulating nest shavings		
	resting		
	self-grooming		
	eating		
	gnawing		
	<i>drinking</i>		
	<i>rearing</i>		
	<i>sniffing</i>		
	<i>digging</i>		
	<i>climbing</i>		
	<i>walking</i>		
	<i>scanning</i>		
	<i>urination/defecation</i>		
stereotypy			

4.3.3 Nachzuchtverhalten

Das Verhalten der Nachkommen wurde vom Absatz bis zur Versuchswoche 12 kontinuierlich erfasst. Die Tiere wurden in drei 4-Wochen-Intervallen beobachtet (Abb. 4-4). Hierbei wurden sie fünf Mal am Tag für je eine halbe Stunde überwacht, wobei innerhalb der 30 Minuten das gezeigte Verhalten alle drei Minuten differenziert wurde. Sodass das Verhalten jedes Tieres im Rahmen der 12 Wochen insgesamt 4620 Mal erfasst wurde. Allerdings gab es in einer Nacht technische Probleme, deshalb fehlen bei den ersten zehn Tieren vier Aufnahmeperioden, also 44 Beobachtungen.

Intervall 1:	0.00 Uhr	6.00 Uhr	10.00 Uhr	14.00 Uhr	18.00 Uhr
Intervall 2:	1.00 Uhr	7.00 Uhr	11.00 Uhr	15.00 Uhr	19.00 Uhr
Intervall 3:	2.00 Uhr	8.00 Uhr	12.00 Uhr	16.00 Uhr	20.00 Uhr
<p>= 5 x 30 min / Tag</p> <p>Verhalten alle 3 Minuten erfasst: = 11 Beobachtungen / 30 min</p> <p>5 x 30 min á 11 Beobachtungen = 55 Beobachtungen / Tier / Tag</p> <p>5 x 30 min á 11 Beobachtungen über 12 Wochen = 4620 Beobachtungen / Tier / Versuch</p>					

Abb. 4-4: Auflistung der Beobachtungsintervalle und der Gesamtbeobachtungen pro Tier während der Erfassung des Nachzuchtverhaltens.

Zur Beurteilung des Verhaltens der Tiere wurde ein Protokoll erstellt, das sich wiederum an dem Maus-Ethogramm der Stanford School of Medicine (<http://mousebehavior.org/>) orientiert. Erfasst wurde hierbei, ob das Tier zum Zeitpunkt der Beobachtung inaktiv war (*immobility*). Dazu zählte, ob es geschlafen oder sich ausgeruht hat oder ob es sich im Nest befand und das genaue Verhalten nicht detektiert werden konnte. Alle anderen Verhaltensweisen wurden identisch zur Erfassung des nicht-mütterlichen Verhaltens definiert und evaluiert. Um den Bias durch den Beobachter zu reduzieren, wurden die Käfigzuordnungen bei den Videoauswertungen ausgeblendet und die Kameranummern täglich gewechselt. Die Zuordnung der Videoauswertung zu den entsprechenden Tieren erfolgte jeweils erst nach der Analyse.

Tabelle 4-4: Protokoll zur detaillierten Erfassung des Nachzuchtverhaltens.

Offspring behaviour	immobility		
	manipulating nest shavings		
	self-grooming		
	eating		
	gnawing		
	climbing		
	rearing		
	digging		
	<i>drinking</i>		<i>other</i>
	<i>sniffing</i>		
	<i>walking</i>		
	<i>scanning</i>		
	<i>urination/defecation</i>		
	stereotypy		

Stereotypes Verhalten

Die FVB/NJ Mäuse, die in dieser Studie Verwendung fanden, zeigen vorrangig drei Formen stereotypen Verhaltens. Das Kreiseln, oder „**circuit running**“, ist definiert als das anhaltende Ablaufen einer identischen kreisförmigen Route entlang des Käfigbodens im oder entgegen des Uhrzeigersinns. Das „**back-flipping**“ ist ein Rückwärtssalto entlang der Längsseite des Käfigs, der entweder an der Futterraufe oder auf der gegenüberliegenden Käfigseite beginnt und je auf der entsprechend anderen Seite endet, mit oder ohne Einbeziehung des Käfiggitters während des Sprungs. Diese beiden Verhaltensweisen wurden als stereotyp definiert, wenn sie mindestens drei Mal nacheinander gezeigt wurden, ohne Pausen zwischen den Verhaltensabläufen, die länger als drei Sekunden waren. Außerdem zeigen FVB/NJ Mäuse stereotypes „**wire gnawing**“, auch bekannt als „bar-mouthing“. Damit ist gemeint, dass die Tiere mit den Vordergliedmaßen am Käfiggitter hängen, während sie es vehement mit den Zähnen benagen. Dies kann punktuell geschehen oder während sich die Tiere entlang der Gitterstäbe bewegen. Das Benagen des Käfiggitters wurde als stereotyp definiert, wenn es über einen Zeitraum von mindestens zehn Sekunden wiederholt wurde und ohne Pausen, die länger als drei Sekunden waren, ausgeführt wurde.

4.3.4 Open Field Test

Im Rahmen des Open Field Tests werden die Tiere in eine neue Umgebung verbracht. Dies stellt eine Situation dar, in der sie mit bisher unbekanntem Gerüchen, Geräuschen und Lichtverhältnissen konfrontiert werden. Bei dem Open Field Test handelt es sich um eine validierte Methode, um das Raumnutzungsverhalten von Mäusen zu beurteilen, ängstliches

und exploratives Verhalten zu charakterisieren und Rückschlüsse auf die körperliche Fitness des Tieres zu ziehen (Belzung and Griebel, 2001).

Konstruktion

Für diese Studie wurde ein kreisförmiges Open Field mit einem Innendurchmesser von 95 cm konstruiert (Abb. 4-5). Die 50 cm hohen Wände des Open Fields bestanden aus Edelstahlblech. Da das automatisierte Aktivitätsüberwachungssystem (ANY-maze Version 4.99 m; Stoelting, Irland) mit dem das Aktivitätsprofil der Tiere aufgezeichnet wurde, mit Farbkontrasten arbeitet, um die Tiere zu erkennen und die FVB/NJ Mäuse albinotisch sind (dementsprechend die Fellfarbe weiß ist), musste das gesamte Open Field möglichst in dunklen Farbtönen gehalten werden. Die Wände des Open Fields wurden daher mit schwarzer, matter Tafelfolie beklebt. Den Untergrund des Testsystems bildete dunkelbraunes Linoleum. Das Open Field wurde mit indirektem Licht beleuchtet und die umgebenden Wände mit weißem Stoff abgedeckt. Große Wichtigkeit bestand hierbei darin, keine Schatten zu verursachen, da diese potentiell die Testergebnisse beeinflussen könnten. Über dem Open Field, in 150 cm Höhe, befand sich die Kamerahalterung. An ihr waren zwei Kameras befestigt. Eine wurde zur Aufzeichnung des Tieres genutzt (HD Pro Webcam C920; Logitech, Lausanne, Schweiz) und war mit der Software verbunden, die andere diente lediglich als Infrarotquelle (DCS-932L; D-Link GmbH), um das Tier auch bei Nacht verfolgen zu können.

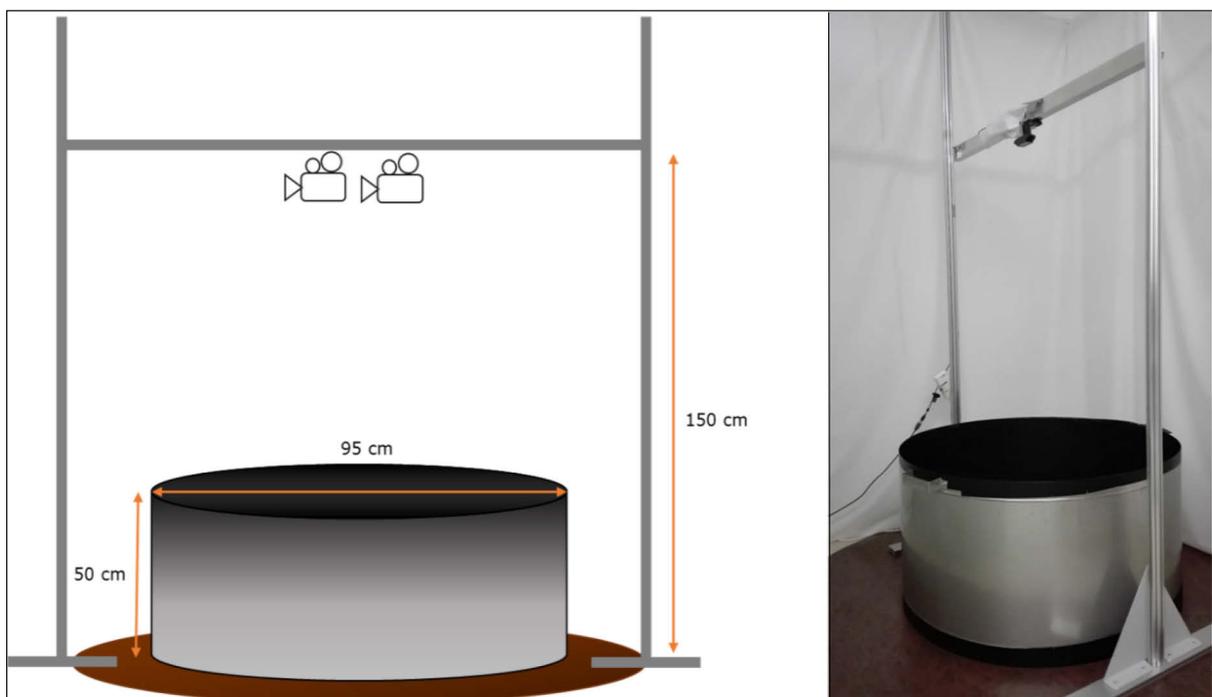


Abb. 4-5: Konstruktion des Open Fields zur Erfassung des Explorationsverhaltens. Links schematisch, rechts im Versuchsaufbau.

Zonierung des Open Fields

Gedanklich wurde das Open Field in drei Bereiche (Zentrum, mittlere Zone, äußere Zone) aufgeteilt. Das Zentrum wurde als der Bereich definiert, der durch die Transportplattform begrenzt war. Auf der Plattform wurden ein rotes Kunststoff-Haus und eine dunkelblaue Serviette platziert, die mit einer nicht transparenten Abdeckung bedeckt waren. Diese, in Abb. 4-6 gezeigte, Kombination repräsentierte den Ausgangspunkt für jeden Test und lieferte Schutz und eine Nestbaumöglichkeit während des 24-Stunden-Tests. Sie diente außerdem zum Transport des Tieres aus dem Käfig ins Open Field. Sobald die Abdeckung abgenommen wurde, startete der Test.



Abb. 4-6: Kombination im Zentrum des Open Fields. Links mit Abdeckung zum Transfer der Tiere in das Open Field, rechts ohne Abdeckung.

Die äußere Zone wurde als der Bereich definiert, der durch die Wände des Open Fields begrenzt wurde, einschließlich eines 12 cm breiten inneren Korridors. Die mittlere Zone war der Bereich zwischen der äußeren Zone und dem Zentrum (Abb. 4-7). Im Aufbau des Open Fields dieser Studie hielt sich demzufolge ein besonders exploratives Tier vermehrt in der mittleren Zone auf, wohingegen ein eher ängstliches Tier viel Zeit im Zentrum, respektive im Haus verbringt.

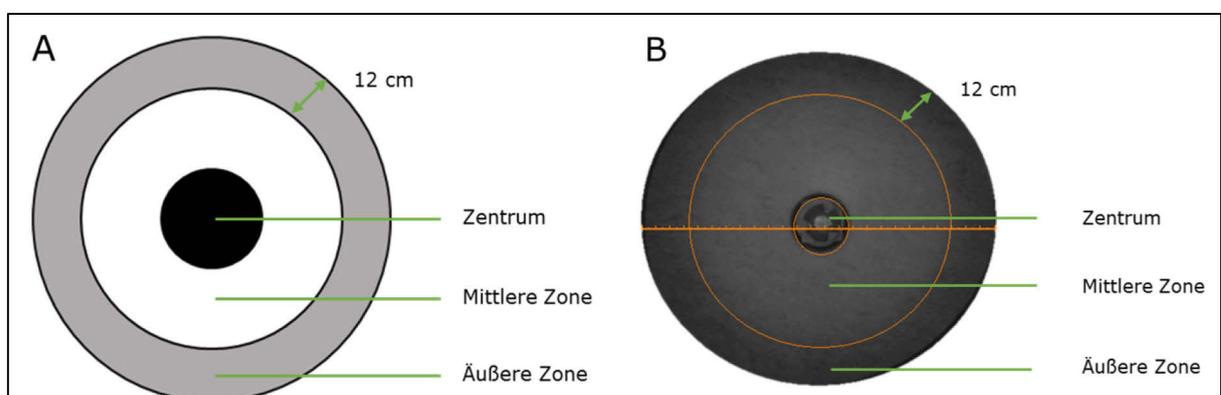


Abb. 4-7: Einteilung des Open Fields in die verschiedenen Zonen. (A) Schematische Darstellung (B) Im Versuchsaufbau; Zonen mittels ANY-maze Software eingeteilt; mittlerer Querstreifen stellt das Messinstrument zur Festlegung des Durchmessers des Open Fields dar.

Während des 24-Stunden-Open-Field-Tests wurde zusätzlich ein Bereich eingerichtet, in dem sich eine Raufe mit Futter und Wasser *ad libitum* befand. Diese Raufe bestand aus einem Käfiggitter eines Haltungskäfigs, an dessen Ecken vier Edelstahlrohre als Standbeine befestigt wurden.

Ablauf des Open Field Tests

Am Tag der Testung wurde die Maus aus dem Käfig genommen und mit Hilfe der im oberen Abschnitt beschriebenen Transportplattform im Zentrum des Open Fields positioniert. Das Tier hatte eine Minute Zeit sich zu akklimatisieren bevor die Abdeckung abgenommen wurde und der Test startete. Jeder Open Field Test fand am Morgen zwischen 09.00 und 11.00 Uhr statt. Der erste Open Field Test wurde in der Versuchswoche zehn durchgeführt, der zweite in der Versuchswoche 11, beide Tests dauerten je fünf Minuten pro Tier. Hier wurden vor allen Dingen Parameter zur Beurteilung des Angst- bzw. Explorationsverhaltens analysiert. Der dritte Test fand in Versuchswoche 12 statt und dauerte 24 Stunden, um Daten zum Raumnutzungsverhalten und zur körperlichen Fitness zu sammeln. Zwischen jedem Tier wurde das Open Field mit Seifenwasser gereinigt und mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Zielparameter

Das automatisierte Aktivitätsüberwachungssystem registrierte die zurückgelegten Distanzen pro Tier (m), die durchschnittliche Fortbewegungsgeschwindigkeit (m/s), die Rotationen des Tieres um die eigene Körperachse (im oder entgegen des Uhrzeigersinns) und die Zeit, in der die Tiere inaktiv waren (s). Als inaktiv wurden hier Tiere erfasst, die sich mindestens fünf Sekunden lang nicht bewegt haben. Es wurde festgelegt die Körpermitte des Tieres als Bezugspunkt zu verwenden, um den Eintritt in bzw. den Austritt aus einer bestimmten Zone aufzuzeichnen. Abhängig von dieser Einstellung, wurde außerdem die Zeit (s) gemessen, die das Tier in dem jeweiligen Bereich verbracht hat.

4.3.5 Indirekte Tierkalorimetrie

In der Versuchswoche 12 wurden die Tiere in die Messeinrichtung der ITK (Phenomaster, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) verbracht. Zunächst hatten die Mäuse zwei Tage Zeit zur Adaptation. In dieser Zeit wurde die Futter- und Wasseraufnahme kontrolliert, um zu überprüfen ob die Tiere sich an die speziellen Futterraufen und Tränkeinrichtungen, die mit einer Hängewaage versehen waren, gewöhnt haben. Die Käfige entsprachen von der Größe und der Einrichtung her den ursprünglichen Haltungskäfigen. Allerdings handelt es sich hierbei um Respirationskäfige mit einem speziell konstruierten, luftdicht verschlossenen Deckel ohne Käfiggitter, der eine

kontinuierliche Zu- und Abfuhr von Atemluft ermöglicht. Mit Hilfe der Online-Messung der Konzentration von Sauerstoff und Kohlendioxid in der Ein- und Ausatemluft können der Energieumsatz sowie der respiratorische Quotient (RQ) berechnet werden. Anhand des RQ kann abgeschätzt werden, welche Substrate (Protein, Fett, Kohlenhydrate) der Organismus zur Gewinnung von Energie vorwiegend heranzieht (Abschätzung der Substratoxidation). Außerdem erfolgten in diesen Käfigen die Bestimmung der Wasser- und Futteraufnahme. Darüber hinaus wurde anhand von integrierten Infrarotschranken Aktivitätsprofile der Tiere erstellt. Die eigentliche Messperiode betrug drei Tage.

4.3.6 Blutentnahmen

Blutentnahmen erfolgten zwei Wochen nach dem Absetzen, in Versuchswoche sieben und final während der Organentnahme zu Beginn der Versuchswoche 13. Die erste und die zweite Blutentnahme erfolgten unter kurzer Isoflurananästhesie durch Punktion des retrobulbären Venenplexus. Dabei wurden durch einen Nackengriff die Halsvenen gestaut und mit einer Kapillare unter Druck mit leichten Rotationsbewegungen im medialen Augenwinkel in Richtung gegenüberliegendes Kiefergelenk durch die Konjunktiven der Venenplexus punktiert und so ca. 100 µl in einer EDTA-beschichteten Microvette aufgenommen. Die finale Blutentnahme erfolgte mittels Herzpunktion unter tiefer Isoflurannarkose. Hierbei wurde das Tier in Rückenlage positioniert und von ventral leicht links lateral des Sternums das Herz punktiert. So konnte etwa 1 ml Blut pro Tier entnommen und wiederum in eine EDTA-beschichteten Microvette überführt werden.

4.3.7 Blutanalyse

Aus den mit EDTA versetzten Microvetten wurde mit einem vollautomatischen Hämatologieanalysegerät (Abacus Junior Vet; Guder Medizintechnik GmbH & Co. KG, Bad Oeynhausen, Deutschland) ein Differentialblutbild erstellt und mittels Schnelltests die Blutglucose (Contour next; Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), Triglyceride, Cholesterin und Laktat (Accutrend Plus; Roche, Berlin, Deutschland) bestimmt. Die Auswertung der Blutwerte befindet sich im Anhang.

4.3.8 Bestimmung des Körpergewichts

Das Körpergewicht wurde beim Absetzen und von da an wöchentlich bis zum Versuchsende erfasst.

4.3.9 Sammlung fäkaler Proben

Ungefähr zehn Kotpellets wurden als zufällig ausgewählte Proben während des wöchentlichen Umsetzens aus dem Käfig der letzten Woche gesammelt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.3.10 Bestimmung der Körperzusammensetzung

Die nicht-invasive Bestimmung der Körperzusammensetzung erfolgte mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR; Echo MRI™ – 100 H; Echo Medical Systems, USA) beim Absatz, in Versuchswoche 7 und am Ende der Versuchswoche 12. Für diese Messmethode ist keine Narkose notwendig. Hierbei wird ein magnetisches Feld erzeugt und dadurch die charakteristische Kernresonanz bestimmter Atome oder funktioneller Gruppen verändert, wodurch Rückschlüsse auf die Molekülstruktur gezogen werden können. Diese Eigenschaft wird für die Unterscheidung von Muskelmasse und Fettmasse genutzt. Die Messung erfolgt in einem Zeitraum von ca. 40 Sekunden. Dazu wurden die Tiere in eine rote Plexiglas-Röhre von 6 cm Durchmesser verbracht, die in das Gerät eingeführt wurde. Nach abgeschlossener Messung wurden die Tiere sofort wieder in ihren Haltungskäfig gesetzt.

4.3.11 Euthanasie

Zu Beginn der Versuchswoche 13, am Tag der Organentnahme, wurden die Tiere um 10.00 Uhr (± 1 h) mittels Isoflurannarkose tief anästhetisiert und via finaler Herzpunktion entblutet. Ein Teil des Blutes wurde in einer mit EDTA versetzten Microvette aufgefangen und bis zur Weiterverarbeitung auf den Rotator gelegt.

4.3.12 Bestimmung der Körperlänge

Zur Bestimmung der Körperlänge wurde die Maus auf einem Korkbrett fixiert, dessen Oberseite mit laminiertem Millimeterpapier bespannt war. Um die Nasenspitze sicher auf Höhe der Nulllinie zu positionieren, wurde mit einer Kanüle durch das *Septum nasi* (Nasenscheidewand) gestochen und anhand des Millimeterpapiers die Länge von der Nasenspitze bis zum Schwanzansatz, bzw. der Schwanzspitze gemessen.

4.3.13 Sektion

Entnahme des braunen Fettgewebes (BAT)

Zuerst wurde das Fell im Nackenbereich mit 70%igem Ethanol desinfiziert, die Haut eröffnet und das nun zum Vorschein kommende braune Fettgewebe entnommen. Vorhandene Anteile weißen Fettes wurden entfernt, das braune Fettgewebe mit der Feinwaage gewogen und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Entnahme des Gehirns

Der Kopf wurde mit einem Scherenschlag abgesetzt und die Haut vom Schädel abpräpariert. Nun wurde das *Os frontale* zwischen den beiden Augenhöhlen mit einer Schere durchtrennt und beidseits vom jeweiligen lateralen Augenwinkel bis zum *Os occipitale* geschnitten ohne das Gehirn zu verletzen. Nun konnte die Schädeldecke nach caudal angehoben und das Gehirn entnommen werden. Anteile des verlängerten Rückenmarks

(*Medulla oblongata*) wurden entfernt, das Gehirn gewogen und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Eröffnung der Bauchhöhle

Das Fell wurde wiederum mit 70%igem Ethanol besprüht und die Bauchhöhle mit einem U-förmigen Schnitt durch Haut und Muskulatur, beginnend im Beckenbereich, fortschreitend bis zu den jeweiligen Rippenbögen, eröffnet.

Entnahme der Milz

Die Milz wurde im caudalen Anteil mit der Pinzette gegriffen, von Pankreas, Fett und Gekröse befreit und entnommen. Das Gewicht wurde mit der Feinwaage bestimmt. Das craniale Drittel wurde abgetrennt und für histologische Analysen in Einbettkassetten verpackt und in 4% Formaldehyd überführt. Der caudale Anteil wurde in Kryoröhrchen transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Entnahme der Leber

Die Leber wurde an der ventralen Seite mit der Pinzette fixiert und unter Abtrennung der Portalvene und anderer anatomischer Strukturen entnommen und das Gesamtgewicht bestimmt. Ein Drittel des linken medialen Leberlappens (*Lobus hepatis lateralis sinister*) wurde abgetrennt, in eine Histosette überführt und in Formaldehyd fixiert. Der *Lobus hepatis medialis sinister* und der *Lobus hepatis medialis dexter* wurden getrennt voneinander je in ein Kryoröhrchen transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Entnahme des Herzens

Der Brustkorb wurde unter Durchtrennung der Rippen eröffnet und das Herz entnommen. Eventuell noch intracardial vorhandenes Blut wurde durch vorsichtigen Druck aus dem Herzen entfernt und das Herzgewicht bestimmt. Das Herz wurde in drei Teile zerlegt. Herzbasis und Herzspitze wurden getrennt voneinander je in ein Kryoröhrchen gegeben und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Der mittlere Teil des Herzens wurde in eine Histosette verpackt und in Formaldehyd fixiert.

Entnahme des *Musculus quadriceps*

Die Haut an der Hintergliedmaße wurde mit 70%igem Ethanol benetzt und danach entfernt. Mit der einen Hand wurde der Unterschenkel fixiert, mit der anderen Hand der Muskel beginnend an der Kniescheibe entlang des Femurs abgetrennt. Anhaftendes Fett wurde entfernt. Der M. quadriceps des linken Beines wurde in einer Histosette in Formaldehyd gegeben und der Muskel der rechten Hintergliedmaße in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Entnahme des *Musculus soleus*

Mit der einen Hand wurde die distale Extremität des Tieres festgehalten. Dann wurde mit einer spitzen Schere zwischen der Achillessehne und dem Unterschenkelknochen, bzw. dem Calcaneus, eingestochen und die Achillessehne durchtrennt. Nun wurde das abgetrennte Ende der Achillessehne mit einer Klemme fixiert und das gesamte Muskelpaket des Unterschenkels nach proximal gezogen. Der sich nun auf der Unterseite aufspannende dünne Muskel (M. soleus) wurde herausgetrennt. Der M. soleus des linken Beines wurde in einer Histosette in Formaldehyd gegeben und der Muskel der rechten Hintergliedmaße in Aluminiumfolie verpackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Lagerung der Organe

Alle Stickstoff-fixierten Organe wurden anschließend bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die in Formaldehyd fixierten Organe wurden am Folgetag weiterverarbeitet.

4.4 Labordiagnostische Methoden

4.4.1 Analyse der fäkalen Corticosteroide

Extraktion fäkaler Corticosteroide

Angelehnt an die Methoden von RUNNING (Running, 2015) und KUO (Kuo et al., 2011), wurden 0,14g (\pm 0,05 g) der aufgetauten fäkalen Pellets eingewogen und mit der neunfachen Menge 80%igen Methanols versetzt. Die Proben wurden dann für 20 Minuten im Thermomixer bei 75°C gekocht und gleichzeitig bei 900 rpm geschüttelt. Nachdem fünf Keramikugeln zu jedem Röhrchen hinzugefügt wurden, wurden die Proben zuerst manuell zerkleinert und danach für fünf Minuten gevortext. Anschließend wurden sie bei 13.000 x g und Raumtemperatur für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Fäkaler Corticosteron Assay

Die fäkalen Corticosterongehalte wurden im aufgetauten Überstand gemäß Herstellerangaben mittels Corticosteron ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay) Kit bestimmt und die Absorptionen mit dem Plattenphotometer gemessen. In dem Kit wird ein polyklonaler Antikörper gegen Corticosteron verwendet, der in kompetitiver Weise an Corticosteron im Standard, in der Probe oder an ein Alkalische-Phosphatase-Molekül, das kovalent an Corticosteron gebunden ist, bindet. Die Intensität des entstandenen Farbtons ist demnach umgekehrt proportional zur Corticosteronkonzentration der Probe, bzw. des Standards.

Fäkaler Cortisol Assay

Die fäkalen Cortisolgehalte wurden im aufgetauten Überstand gemäß Herstellerangaben mittels Cortisol ELISA Kit bestimmt und die Absorptionen mit dem Plattenphotometer gemessen. In dem Kit wird ein monoklonaler Antikörper gegen Cortisol verwendet, der in kompetitiver Weise an Corticosteron im Standard, in der Probe oder an ein Alkalische-Phosphatase-Molekül, das kovalent an Corticosteron gebunden ist, bindet. Die Intensität des entstandenen Farbtönen ist demnach umgekehrt proportional zur Cortisolkonzentration der Probe, bzw. des Standards.

4.4.2 Analyse von Dopamin und Serotonin im Gehirn

Die Neurotransmitter Dopamin (DA) und Serotonin (SRT) wurden aus Gesamtgehirn-Lysaten mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Zunächst wurden die zu untersuchenden Neurotransmitter aus dem Probenmaterial extrahiert. Im Anschluss fand eine chromatographische Auftrennung des Extraktionsgemisches statt. Letztlich konnten die Analyten mit Hilfe eines Triplequadrupol-Massenspektrometers unter Verwendung des Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus quantifiziert werden.

LC-MS/MS-Prinzip

Ein chromatographisches Trennsystem (hier Flüssigkeitschromatographie; LC) wird über ein Elektrospray-Ionisations (ESI)-Interface an ein Triplequadrupol-Massenspektrometer gekoppelt. Bei Anwendung des MRM-Modus wie im vorliegenden Fall, dient der erste Quadrupol (Q1) als Massenfilter. Es werden Precursor-Ionen anhand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) selektiert. Diese durchqueren auf stabilen Bahnen den Quadrupol. Andere Ionen mit einem abweichenden m/z werden herausgefiltert. Es schließt sich eine Kollisionszelle (Q2) an. Hier fragmentieren die Precursor-Ionen in charakteristische Produkt-Ionen durch Kollisions-induzierte Dissoziation (collision-induced dissociation; CID) durch Einleitung eines Inertgases (hier: N_2). Die Funktionsweise des dritten Quadrupols (Q3) ist analog zu jener von Q1. Allerdings werden hier nun die Produkt-Ionen anhand ihres m/z selektiert. Man erhält als Ergebnis einer MRM-Analyse ein Signal stellvertretend für eine substanzspezifische Fragmentierung, einen sogenannten Massenübergang (m/z Precursor-Ion > Produkt-Ion). Zur Erhöhung der Spezifität analysiert man in der Regel mehrere solcher Massenübergänge pro zu analysierender Substanz. Den Massenübergang höchster Intensität bezeichnet man als *quantifier*, alle weiteren als *qualifier*.

Herstellung des Extraktionspuffers

Der Extraktionspuffer wurde direkt vor der Analyse frisch hergestellt. In Übereinstimmung mit der zuvor beschriebenen Methode (Schumacher et al., 2015) bestand der Puffer aus 0,002 M Natriumthiosulfat in 0,2 M Perchlorsäure. Abweichend wurden jedoch höhere

Mengen an isotope-markierten internen Standards zugesetzt, nämlich 500 nM SRT-d₄ und 1000 nM DA-d₄.

Gewebeaufbereitung

Die Gehirne wurden gewogen, in neue Röhrchen transferiert und während der weiterfolgenden Verarbeitung kontinuierlich auf Eis gelagert. 15 Keramikkugeln und 2,0 ml Extraktionspuffer wurden zu jeder Probe hinzugegeben. Die Proben wurden fünf Mal für je 30 Sekunden im Homogenisierer (Bead Ruptor 12; Biolab Products GmbH, Bebensee, Deutschland) gemischt. Zwischen jedem Homogenisierungsschritt wurden die Proben für eine Minute auf Eis gestellt. Die nun homogenisierten Proben wurden bei 16.000 x *g* und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (Jouan C3i Multifunction Centrifuge Series; Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). 1 ml des Überstands wurde in ein neues Röhrchen überführt und wiederum bei 16.000 x *g* und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde für die LC-MS/MS Analyse verwendet.

Serotonin und Dopamin Bestimmung

Für die Analysen wurde ein Agilent 1260 Infinity LC System, gekoppelt an ein Agilent 6490 Triple Quadrupol-Massenspektrometer (beides Agilent Technologies; Waldbronn, Deutschland), verknüpft mit einer Elektronenspray Ionenquelle, welche im positiven Ionen Modus (ESI+) arbeitet, verwendet. Die Quantifizierung der Neurotransmitter erfolgte, wie oben beschrieben, anhand der Massenübergänge des Analyten im Verhältnis zu den Massenübergängen der deuterierten internen Standards.

Weiterführende Untersuchungen

Im Anhang H.3 befinden sich die detaillierte Beschreibung der weiterführenden Untersuchungen zur gehirnarealspezifischen Analyse der SRT und DA Gehalte, deren Ergebnisse und Interpretationsmöglichkeiten.

4.4.3 Glykogenbestimmung in Leber und Muskel

Die Glykogen- und Triglyceridbestimmung in den Geweben erfolgte entsprechend der von der DIfE-Arbeitsgruppe „Physiologie des Energiestoffwechsels“ etablierten Methode (Walter and Klaus, 2014).

Gewebeaufbereitung

Zur Bestimmung des Glykogengehalts wurden die zuvor in Stickstoff fixierten und bei -80°C gelagerten Proben des *M. quadriceps* und des *Lobus hepatis medialis sinister* mit dem Mikrotom bei -20 °C in 10 µm feine Abschnitte geschnitten und durch Zugabe von 3 gekühlten Keramikkugeln und kurzes Vortexen zu einem homogenen Pulver verarbeitet. Für die Glykogenbestimmung wurden 35 mg Leberhomogenat und 50 mg

Muskelhomogenat (und weitere 40 mg des Muskelhomogenats für die Triglyceridbestimmung) in neue Kryoröhrchen überführt und bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf einem Eisblock, zwischen den Arbeitsschritten und beim Transport wurden die Proben auf Eis gestellt. Zu jeder Probe wurden 750 µl 0,1n Natronlauge (NaOH) / 50mg Muskel bzw. 35 mg Leber und je 10 Zirkoniumkugeln hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben für drei Minuten in der Kugelmühle (mit gekühltem Aufsatz) lysiert. Nach kurzem Zentrifugieren, um eventuelle Luftblasen zu zerstören, wurde das Lysat in neue, eisgekühlte Reaktionsgefäße überführt und wiederum auf Eis gestellt. Die Proben wurden nun für 45 min, bei 75 °C und 1000 rpm im Thermoshaker (Thermoshaker TS1; Biometra GmbH, Göttingen) inkubiert. Danach wurden die Proben gevortext, für fünf Minuten auf Eis gestellt und wieder gevortext. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (45 min, 4°C, 12.400 x g) wurde der so erhaltene Überstand in ein neues Röhrchen überführt und erneut für 30 min, bei 4°C und 12.400 x g zentrifugiert. So erhielt man einen sehr klaren Überstand, von dem 500 µl aliquotiert und auf Eis gelagert wurden.

Glykogenbestimmung

Die Bestimmung des Glykogengehalts der Leber bzw. des Muskels erfolgte als Dreifachbestimmung aus dem aliquotierten Überstand mittels UV-Test zur Bestimmung von nativer Stärke und von Stärkepartialhydrolysaten (BioAnalysis Stärke; R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) gemäß Herstellerangaben des Kits.

4.4.4 Triglyceridbestimmung im Muskel

Herstellung des Homogenisierungs-Puffers

Der Puffer für die Gewebeextraktion bestand aus 10 mM Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat, versetzt mit 1 mM EDTA und 1% Polyoxyetylen-10-tridecyl Ether (pH 7,4).

Gewebeaufbereitung

Der Lysieransatz bestand aus 400 µl Homogenisierungs-Puffer pro 40 mg des Muskelhomogenats. Zwei Drittel des errechneten Puffervolumens wurden zu dem Muskelhomogenat pipettiert und nach Zugabe von 10 Zirkoniumkugeln für 3 Minuten in der Kugelmühle lysiert. Nach kurzem Zentrifugieren, um Luftblasen zu verhindern und eventuell abgesetztes Fett vom Rand zu entfernen und mit in das neue Röhrchen zu überführen, wurde das Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Das restliche Drittel wurde genutzt, um die Zirkoniumkugeln zu „waschen“ und so die Ausbeute zu maximieren. Beide Lysate wurden vereinigt und für 30 min bei 4°C und 23.100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, gekühltes Reaktionsgefäß gegeben. Hier war darauf zu achten, dass sich die fettige Phase zum Teil am Rand abgesetzt hat und man deshalb vorsichtig mit der Pipette den Rand spülen musste. Die Proben wurden nun

für 5 min, bei 70 °C und 600 rpm im Thermoshaker (Thermoshaker TS1; Biometra GmbH, Göttingen) inkubiert, für 5 min auf Eis gestellt und erneut für 30 min bei 4°C und 23.100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

Triglyceridbestimmung

Mit Hilfe eines Kits zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von Triglyceriden und freiem Glycerol (Triglyceride Reagent, Free Glycerol Reagent; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) erfolgte die Analyse als Triplikat aus dem gewonnenen Überstand.

Proteinbestimmung

Als Referenz für die Glykogen- und Triglyceridbestimmung wurde aus dem Überstand, ebenfalls als Triplikat, der Proteingehalt der jeweiligen Probe bestimmt (DC Protein Assay Reagents Package, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Das Verfahren basiert auf der Reaktion von Protein mit einer alkalischen Kupfer(Cu)-Tartrat-Lösung und Folin-Reagenz. In der ersten Reaktion (Biuretreaktion) kommt es zu der Bildung eines blau-violetten, quadratisch-planaren Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. In einem zweiten Schritt wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert. Dieses Cu(I) wiederum reduziert das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz [Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren] zu Molybdänblau. Die proportional zur Proteinkonzentration resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung mittels Photometrie bei 750 nm vermessen.

4.5 Histologische Methoden

Alle histologischen Auswertungen wurden, sofern nicht anders erwähnt, am Mikroskop (Axio Imager A1; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit der Axio Vision 4.6.3 Software vorgenommen.

4.5.1 Probenaufbereitung

Die Formaldehyd-fixierten Gewebeproben wurden mit kaltem Leitungswasser gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet, gekühlt und mit dem Mikrotom 2 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden im Wasserbad auf beschichtete Objektträger überführt, getrocknet, entparaffiniert, gefärbt und anschließend permanent eingeschlossen.

4.5.2 Färbungen

Hämatoxylin-Eosin (HE)

Für diese Färbung wurden saures Hämalaun nach Mayer und 1%-wässrige Eosinlösung verwendet. Bei dieser Übersichtsfärbung werden die basophilen Nukleinsäure-reichen Zellbestandteile (Zellkern, raues Endoplasmatisches Retikulum) mit einem basischen

Farbstoff (Eisen-Hämatoxylin) blau gefärbt. Die Rotfärbung azidophiler Strukturen, wie z.B. des Zytoplasmas, der Zellplasmaproteine und der Kollagenfasern erfolgt mit einem sauren Farbstoff (Eosin).

Perjod-Acid-Schiff Reaktion-Färbung (PAS)

Die Schnitte werden in 1%iger Perjodsäurelösung oxidiert, in destilliertem Wasser gespült, danach in Schiff'sches Reagenz überführt und anschließend mit Sulfitwasser gespült. Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser, folgt eine Kernfärbung (siehe HE). Bei dieser Färbung werden Kohlenhydratgruppen mit der Perjodsäure-Schiff's-Reaktion nachgewiesen. Mit Leukofuchsin (Schiff'sches Reagenz) bildet sich ein stabiler roter Farbkomplex, sodass sich Bindegewebe blau darstellt, das Zytoplasma sich rosa färbt und Kerne blau-schwarz erscheinen.

Pikro-Siriusrot-Färbung (SR)

Die entparaffinierten Schnitte werden für eine Stunde in einer Sirius-Red-Lösung gefärbt. Bei dieser Färbung stellen sich Kollagenfasern rot dar, während Muskelfasern und Zytoplasma gelb erscheinen. Die Färbereaktion beruht auf der Bindung der Sulfongruppen des Farbstoffs an die basischen Aminogruppen von Lysin und Hydroxylysin, sowie an die Guanidingruppe des Arginins bei niedrigem pH-Wert. Diese Färbung eignet sich, um den Gesamtkollagenanteil zu bestimmen, während die Differenzierung in verschiedene Kollagentypen unter polarisiertem Licht umstritten ist (Lattouf et al., 2014).

Immunhistologische Färbung des Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA)

Die 2 µm-dicken in Paraffin eingebetteten Präparate der Milz wurden mit Toluol entparaffiniert und über eine absteigende Ethanolreihe bis hin zum destillierten Wasser geführt. Anschließend erfolgte die hitzeinduzierte Vorbehandlung der Schnitte im Mikrowellenofen. Mittels Wasserstoffperoxid (3% H₂O₂ in destilliertem Wasser) wurde danach die endogene Peroxidase blockiert und die Präparate mit einem primären anti-PCNA-Antikörper (Anti-PCNA antibody, rabbit, ab18197, 1:1000 verdünnt; Abcam, Cambridge (UK)) für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dem Spülen mit Tris-Puffer erfolgte eine Inkubation mit Histofine bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Nach erneutem Spülen mit Tris-Puffer erfolgte die Entwicklung der Reaktion mit Diaminobenzidin. Abschließend wurde die Präparate über eine aufsteigende Ethanolreihe und Toluol geführt und mittels Deckglas permanent eingeschlossen.

In der Immunhistochemie äußert sich das Vorhandensein von PCNA in einer schwachen, diffusen Färbung der Zellkerne und des Plasmas. Demgegenüber ist die stabilere PCNA-Fraktion, welche an die Replikationsorte gebunden ist, durch punktförmige nukleäre Strukturen erkennbar.

4.5.3 Kardiomyozytenflächen

In die Analyse gezielt mit einbezogen wurden Kardiomyozyten, deren Zellkern klar abzugrenzen und zentral im Myozyten gelegen war, um sicher zu gehen, dass der Flächeninhalt bei allen Kardiomyozyten in derselben Schnittebene bestimmt wurde. Dazu wurden bei 40-facher Vergrößerung durchschnittlich 100 Kardiomyozyten pro Tier in der PAS-Färbung mit dem Kontur (Spline) Werkzeug der Software vermessen. Die Analysen fanden ausschließlich in der linken Ventrikelwand statt.

4.5.4 Kardiomyozytendiameter

Zur Bestimmung der Kardiomyozytendiameter wurden nur Zellen ausgewählt, die im Querschnitt angeschnitten wurden, deren Zellgrenzen gut dargestellt waren und deren Kern annähernd zentral lag. Vermessen wurden bei 20-facher Vergrößerung zehn Gesichtsfelder jedes PAS-gefärbten Herzschnittes. Pro Gesichtsfeld erfüllten im Durchschnitt zehn Zellen die genannten Kriterien. So wurden durchschnittlich 100 Kardiomyozyten pro Tier vermessen. Ermittelt wurde hier der Diameter durch den Zellkern in Längs- bzw. Querachse der Zelle und die jeweils diagonal verlaufenden Diameter und daraus der Mittelwert gebildet. Die Analysen fanden ausschließlich in der linken Ventrikelwand statt.

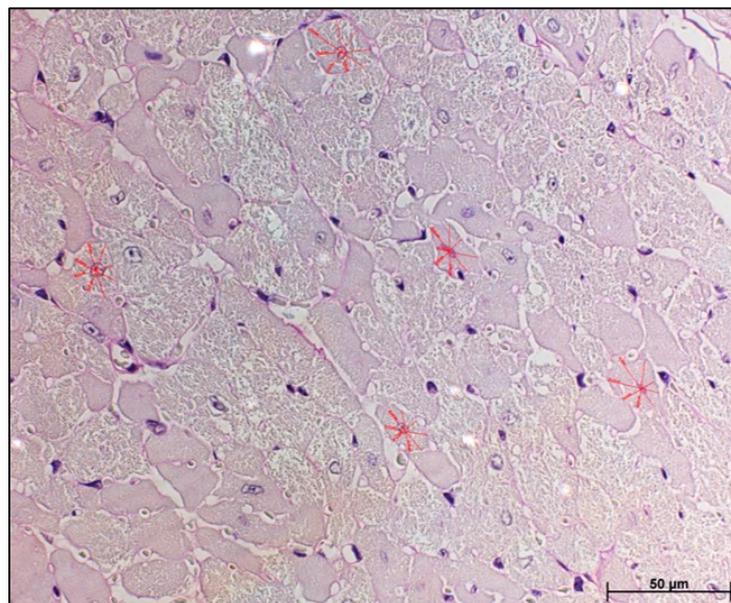


Abb. 4-8: Bestimmung der Diameter der Kardiomyozyten.
Dargestellt sind Kardiomyozyten im Querschnitt und die Bestimmung derer Diameter (quer, längs, diagonal). Färbung: PAS, Vergrößerung: 20x.

4.5.5 Kollagenanteil des Herzens

Zur Bestimmung des Gesamtkollagenanteils des Herzens wurden in der SR-Färbung mit dem Mikroskop und der zugehörigen Kamera bei 40-facher Vergrößerung zehn Bilder pro Gewebsschnitt angefertigt, auf dem Computer (*acer E3-112 series*) gespeichert und

anschließend mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ 1.50i ausgewertet. Um eine präzise Quantifizierung in semiautomatischer Weise zu erreichen, wurde ein NIH ImageJ Plug-In, welches von Gabriel Landini (University of Birmingham) entwickelt wurde, verwendet. Dieses Plug-In ermöglicht es, Makros zu generieren, anhand derer man für jedes Bild einen expliziten Farb-Schwellenwert festlegen kann. Beim Fotografieren war es besonders wichtig keine Blutgefäße aufzunehmen, da diese aufgrund ihres Kollagenanteils die Quantifizierung beeinflusst hätten. Außerdem wurde besonders darauf geachtet, alle Bilder bei annähernd gleicher Lichtintensität anzufertigen, dass die Vergleichbarkeit der Bilder untereinander gewährleistet blieb. Wie in Abb. 4-9 dargestellt, wurden nun anhand des durch Pixelintensitäten präzise definierten Rotton-Schwellenwerts (der dem Kollagen entsprach), im mit Hilfe der Software angefertigten Schwarz-Weiß-Bild des Originalbildes, die entsprechenden Graustufen quantifiziert. Gegebenenfalls vorhandene Artefakte konnten vor der Messung exkludiert werden. Die Analysen fanden ausschließlich in der linken Ventrikelwand statt.

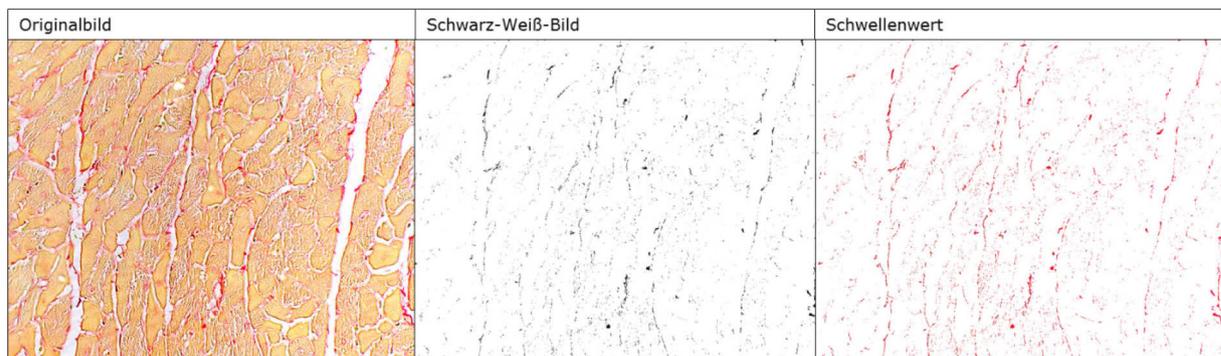


Abb. 4-9: Darstellung der Auswertung der Sirius-Red-Färbung mit ImageJ. Von links nach rechts: Erstellung eines Schwarz-Weiß-Bildes aus dem Original und Festlegung eines Schwellenwertes.

4.5.6 Muskelquerschnittsfläche des *M. soleus*

Pro Tier wurden zwei Muskelquerschnitte auf annähernd gleicher Ebene angefertigt und mit SR gefärbt. Beide wurden vermessen und der Mittelwert der Daten gebildet. Dazu wurden die Querschnitte mit dem Mikroskop und der zugehörigen Kamera bei 20-facher (je nach Muskelgröße auch 10-facher) Vergrößerung komplett fotografiert und durch Umfahren mit dem entsprechenden Werkzeug der Software die Gesamtfläche des jeweiligen Gewebequerschnitts ermittelt.

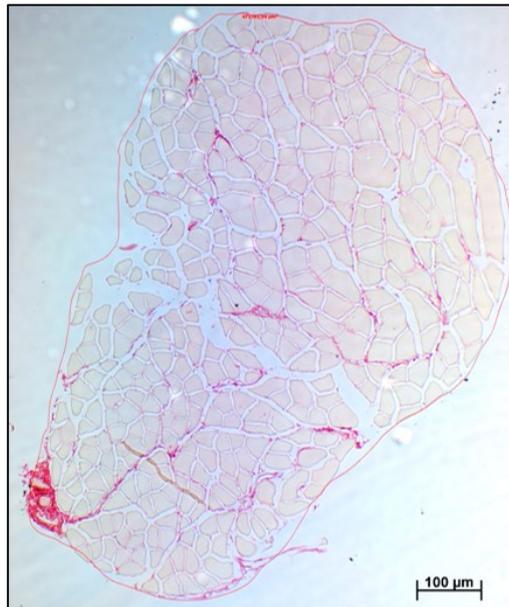


Abb. 4-10: Bestimmung der Querschnittsfläche des *M. soleus*.
Färbung: SR; Vergrößerung: 10x.

4.5.7 Anzahl der Myozyten des *M. soleus*

Von zwei auf annähernd gleicher Ebene liegenden HE-gefärbten Muskelquerschnitten pro Tier wurden bei 10-facher Vergrößerung zwei bis fünf Fotos je Querschnitt angefertigt. Die Anzahl an Myozyten pro Querschnitt wurde ermittelt, anschließend wurde der Mittelwert aus beiden Messungen gebildet.

4.5.8 Diameter der Myozyten des *M. soleus*

Für die Erfassung der Diameter der Myozyten wurden nur Zellen ausgewählt, die im Querschnitt angeschnitten wurden und deren Zellkern deutlich zu erkennen war. Dazu wurden bei 10-facher Vergrößerung im PAS-gefärbten Muskelquerschnitt 2-6 Bilder des Schnittes angefertigt. Durchschnittlich erfüllten zehn Zellen pro Bild die genannten Kriterien, sodass pro Tier 20-60 Zellen vermessen wurden und der Mittelwert aus den jeweiligen Messungen gebildet wurde. Ermittelt wurde hier der Diameter durch den

Zellkern in Längs- bzw. Querachse der Zelle und die jeweils diagonal verlaufenden Diameter und daraus der Mittelwert gebildet.

4.5.9 Diameter der Myozyten des *M. quadriceps*

Für die Erfassung der Diameter der Myozyten wurden nur Zellen ausgewählt, die im Querschnitt angeschnitten wurden und deren Zellkern deutlich zu erkennen war. Dazu wurden bei 20-facher Vergrößerung im PAS-gefärbten Muskelquerschnitt 10 Bilder des Schnittes angefertigt. Durchschnittlich erfüllten fünf Zellen pro Bild die genannten Kriterien, sodass pro Tier 50 Zellen vermessen wurden und der Mittelwert aus den jeweiligen Messungen gebildet wurde. Ermittelt wurde hier der Diameter durch den Zellkern in Längs- bzw. Querachse der Zelle und die jeweils diagonal verlaufenden Diameter und daraus der Mittelwert gebildet.

4.5.10 Kollagenanteil des *M. soleus*

Mit einem Software-generierten Flächenmessprogramm von Axio Vision wurde pro Tier bei zwei auf annähernd gleicher Ebene geschnittenen, SR-gefärbten Muskelquerschnitten in der 10-fachen Vergrößerung der Anteil an Sirius-Red positiv gefärbter Fläche und damit an Gesamtkollagen bestimmt. Dazu wurden beide Querschnitte vermessen und der Mittelwert gebildet.

4.5.11 Kollagenanteil *M. quadriceps*

Mit einem Software-generierten Flächenmessprogramm von Axio Vision wurden pro Tier 10 Bilder eines SR-gefärbten Muskelquerschnitts in der 20-fachen Vergrößerung vermessen. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil an Sirius-Red positiv gefärbter Fläche (respektive Kollagen).

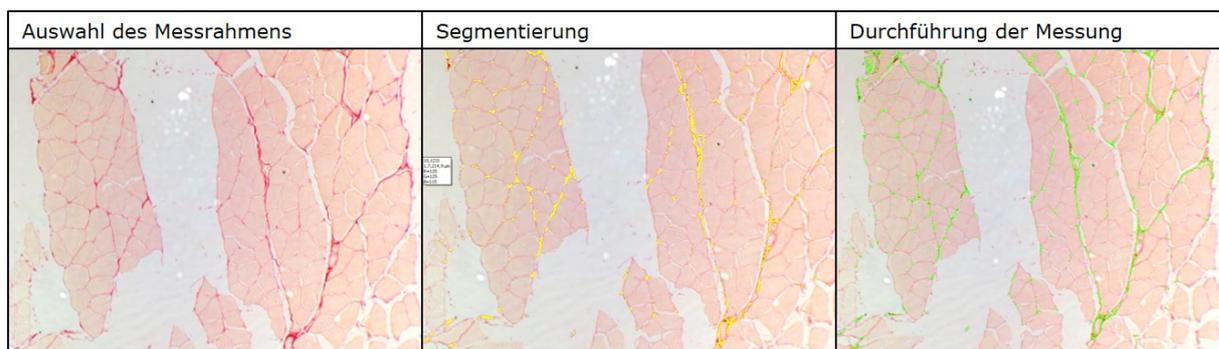


Abb. 4-11: Darstellung der Auswertung der Sirius-Red-Färbung mit Axio Vision. Von links nach rechts: Auswahl des Messrahmens aus dem Original, Segmentierung der zu messenden Flächen und Messung des SR positiv gefärbten Anteils.

4.5.12 Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) der Milz

In die Analyse miteinbezogen wurden nur intensiv gefärbte Zellkerne, die durch dunkle Granulationen charakterisiert sind. Bei einer 40-fachen Vergrößerung wurden pro Tier die PCNA-positiven Zellen in zehn Rastern (Fläche des Rasters: $12,5 \times 12,5 \text{ mm} = 156,25 \text{ mm}^2$) gezählt und der Mittelwert gebildet. Das Raster kann in Abb. 4-12 nicht dargestellt werden, da es sich im Okular befindet und nicht von der Kamera erfasst werden kann.

Rechnung zur Bestimmung der ausgezählten Rasterfläche: $12,5 \times 12,5 \text{ mm} / 400$ (da 400er Gesamtvergrößerung) = $0,03125 \times 0,03125 \text{ mm} = 31,25 \times 31,25 \mu\text{m} = 976,5625 \mu\text{m}^2$; $976,5625 \mu\text{m}^2 \times 10$ (da 10 ausgezählte Raster pro Tier) = $9765,625 \mu\text{m}^2 = 9,765625 \text{ mm}^2$ ausgezählte Fläche pro Tier.

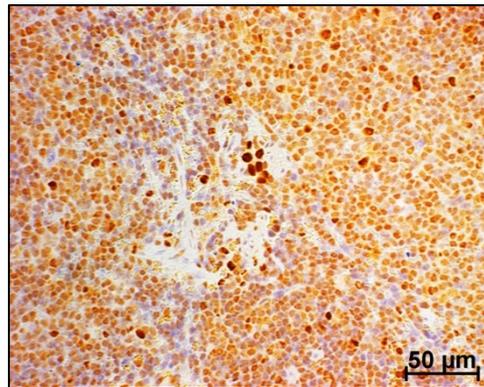


Abb. 4-12: PCNA-Färbung der Milz.
Darstellung der PCNA-positiv gefärbten Zellen der Milz (dunkelbraun);
Vergrößerung: 40x.

4.5.13 Material

Gerät	Hersteller, Sitz (Land)
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen (D)
Feinwaage, Analytics AC120S	Sartorius Lab Instruments GmbH&Co. KG, Göttingen (D)
Flüssigchromatografie, 1260 Infinity LC System	Agilent Technologies, Waldbronn (D)
Hämatologie Schnelltest (Glucose), Contour next	Bayer AG, Leverkusen (D)
Hämatologie Schnelltest (TG, Chol., Lakt.), Accutrend Plus	Roche, Berlin (D)
Hämatologie-Analysegerät, Abacus Junior Vet	Guder Medizintechnik GmbH & Co. KG, Bad Oeynhausen (D)
Homogenisierer, Bead Ruptor 12	Biolab Products GmbH, Bebensee (D)
Homogenisierer, TissueLyser LT	Qiagen, Hilden (D)
Indirekte Tierkalorimetrie, Phenomaster	TSE Systems, Bad Homburg (D)
Kamera, C920	Logitech, Lausanne (CH)
Kamera, DCS-932L	D-Link GmbH, Eschborn (D)
Kernspinresonanzspektroskopie, Echo MRI TM – 100 H	Echo Medical Systems, Houston (USA)
Massenspektrometer, 6490 Triple Quadrupole-MS	Agilent Technologies, Waldbronn (D)
Mikroskop, Axio Imager A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen (D)
Mikrotom, Microm HM-500 M Cryostat	GMI, Minnesota (USA)
Pipetten, Eppendorf Research Multipette Stream	Eppendorf, Hamburg (D)
Plattenphotometer, EON	Biotek Instruments, Berlin (D)
Plattenphotometer, RT-6100	Rayto Life and Analytical Sciences Co., Nanshan (CHN)
Rotator, Taumel-Rollenmischer RM 5	Omnilab, Bremen (D)
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin (D)
Thermoshaker, Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg (D)
Thermoshaker, Thermoshaker TS1	Biometra GmbH, Göttingen (D)

<wird fortgesetzt>

<Fortsetzung>

Tierwaage, MSE 5201S-100-DO	Sartorius Lab Instruments GmbH&Co. KG, Göttingen (D)
Vortexer, Uniprep Gyrator-24	UniEquip, Planegg (D)
Vortexer, Vortex Genie 2	neoLab, Heidelberg (D)
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus, Hanau (D)
Zentrifuge, Heraeus™ Megafuge™ 16 Centrifuge	Thermo Scientific, Schwerte (D)
Zentrifuge, Jouan CR3i	Thermo Scientific, Schwerte (D)
Zentrifuge, MiniSpin	Eppendorf, Hamburg (D)
Substanz	Hersteller, Sitz (Land)
Anti-PCNA antibody, rabbit, ab18197, 1:1000 verdünnt	Abcam, Cambridge (UK)
DA-d4 Hydrochlorid	CDN Isotopes, Pointe-Claire, Canada
Diaminobenzidin	Dako, Glostrup (DNK)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol, reinst	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Formaldehyd 4%	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Hämalaun	eigene Herstellung E. Meyer (DIfE)
Isofluran	CP Pharma, Burgdorf (D)
Methanol, reinst	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Natriumthiosulfat	Sigma- Aldrich, Taufkirchen (D)
Paraffin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
Perchlorsäure	Sigma- Aldrich, Taufkirchen (D)

<wird fortgesetzt>

<Fortsetzung>

Perjodsäurelösung	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Polyoxyetylen-10-tridecylether	Sigma- Aldrich, Taufkirchen (D)
Schiff'sches Reagenz	Merck, Darmstadt (D)
Simple Stain Mouse Max Po R, Universal Immuno-peroxidase Polymer for mouse tissues, Anti-Rabbit	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo (JPN)
Sirius-Red-Färbelösung, Pulver	Sigma- Aldrich, Taufkirchen (D)
SRT-d4 Creatinin-Sulphat-Komplex	CDN Isotopes, Pointe-Claire, Canada
Sulfitwasser	eigene Herstellung E. Meyer (DIfe)
Toluol	Sigma- Aldrich, Taufkirchen (D)
Tris-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Material	Hersteller, Sitz (Land)
Blutröhrchen, Microvette® CB 300 K2E	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht (D)
Einbettkassetten, Uni-Link	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde (D)
Einmal-Injektions-Kanüle 23 G x 1" (0,6 x 25 mm)	Henry Schein Inc., Melville (USA)
Einmal-Spritzen, Omnifix-F	B. Braun AG, Melsungen (D)
Handschuhe (Latex, Nitril)	Mexpo International Inc., California (USA)
Kapillare zur Blutentnahme, Hämatokritkapillare	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt (D)
Keramikkugeln, 2,8 mm Keramik Beads, 21-24-ZY 28.5	Biolab Products GmbH, Bebensee (D)
Keramikkugeln, Zirconia Beads II	Stratec molecular GmbH, Berlin (D)
Kryoröhrchen mit Außengewinde	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Linoleum, Tarkett Veneto, Chocolate	Living Floor GmbH, Essingen, (D)
Operationsbesteck, diverses	Eickemeyer Medizintechnik, Tuttlingen (D)

<wird fortgesetzt>

<Fortsetzung>

Pipettenspitzen, diverse	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Reaktionsgefäß, Seal Safe	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht (D)
Röhrchen für Bead Ruptor, 7 ml Tubes ohne Beads, 21-19-651-02U	Biolab Products GmbH, Bebensee (D)
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin (D)
Kit	Hersteller, Sitz (Land)
BioAnalysis Stärke	R-Biopharm AG, Darmstadt (D)
Corticosterone ELISA Kit (Catalog no. ADI-900-097)	Enzo Life Sciences (USA)
Cortisol ELISA Kit (Catalog no. ADI-900-071)	Enzo Life Sciences (USA)
DC Protein Assay Reagents Package	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Free Glycerol Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Triglyceride Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Software	Hersteller, Sitz (Land)
ANY-maze Version 4.99 m	Stoelting, Dublin (IRL)
Axio Vision 4.6.3	Carl Zeiss AG, Oberkochen (D)
Graph Pad Prism 7	GraphPad Software Inc., La Jolla (USA)
IBM SPSS 20	IBM Deutschland GmbH, Berlin (D)
ImageJ 1.50i	National Institutes of Health, Maryland (USA)
Käfigeinrichtung	Hersteller, Sitz (Land)
Einstreu, LTE E-001 Struktureinstreu	ABEDD Vertrieb GmbH, Wien (A)
Futter, A153F0300	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest (D)
IVC Käfige, SealSafe-IVC Blue Line	Tecniplast, Hohenpeißenberg (D)
Nestmaterial, Nestlets, Alpha-Nest	LBS Serving Biotechnology, Horley (UK)
Papphäuser, Des.Res TM	LBS Serving Biotechnology, Horley (UK)
Kunststoffhaus, Mouse igloo	LBS Serving Biotechnology, Horley (UK)

4.5.14 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten der vorliegenden Arbeit erfolgte mit der Software IBM SPSS 20 (IBM Deutschland GmbH, Berlin (D)). Alle Daten wurden im Rahmen einer deskriptiven Statistik auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk Test) und Homogenität der Varianzen (Levene's Test) geprüft und der adäquate statistische Test ausgewählt. Bei dem Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben (Vergleich nicht-stereotyp / stereotyp) wurde bei intervallskalierten Daten, die normalverteilt sind, der T-Test für unabhängige Stichproben angewandt und bei Daten, die nicht normalverteilt sind, der Wilcoxon-Rangsummen Test (Mann-Whitney-U Test). Bei dem Vergleich von drei oder mehr ungepaarten (unabhängigen) Gruppen (Vergleich zwischen den verschiedenen Formen des stereotypen Verhaltens) wurde bei intervallskalierten Daten, die normalverteilt sind, die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und bei nicht-normalverteilten Daten der Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Die Graphen wurden mit der Software Graph Pad Prism erstellt. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant erachtet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$).

5 Ergebnisse

Sofern nicht anders erwähnt, werden alle Gruppenvergleiche zwischen nicht-stereotypen und stereotypen FVB/NJ-Mäusen als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Alle Daten zu den verschiedenen Formen stereotypen Verhaltens werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt, da die Gruppengröße z.T. kleiner sechs ist.

5.1 Zuchtparameter

Während des Versuchs wurden zehn weibliche FVB/NJ-Mäuse (4 nicht-stereotype, 6 stereotype) 2:1 (2 Weibchen, 1 Bock) mit nicht-stereotypen Männchen verpaart, anhand derer der erste Versuchsabschnitt (Erfassung der *maternal care*) durchgeführt wurde. Daraus gingen 61 Nachkommen in der F₁-Generation hervor. Von den 61 Tieren wurden 35 im Absatzalter für den zweiten Versuchsabschnitt randomisiert ausgewählt. Die übrigen Tiere wurden für die weitere Zucht und andere Projekte verwendet.

Tabelle 5-1: Zuchtparameter. Übersicht der durchschnittlichen Wurfgröße, der Aufzuchtverluste in %, der Anzahl abgesetzter Jungtiere, dem Verhältnis zwischen weiblichen und männlichen (Weibchen/Männchen) und nicht-stereotypen und stereotypen Jungtieren (nST/ST) nicht-stereotyper (n=4) und stereotyper Muttertiere (n=6), dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

	nicht-stereotype Muttertiere	stereotype Muttertiere
Wurfgröße	8,5 \pm 1,76	7,2 \pm 0,86
Aufzuchtverluste (%)	0,0 \pm 0,00	38,8 \pm 19,62
Abgesetzte Junge	8,5 \pm 1,76	5,4 \pm 0,96
Weibchen/Männchen	14/20	15/12
nST/ST	23/11	14/13

Die Aufzuchtverluste variierten stark zwischen den stereotypen Muttertieren. Von zwei stereotypen Muttertieren wurden alle geborenen Jungtiere erfolgreich abgesetzt. Ein Muttertier verlor eins von acht Jungtieren, ein weiteres verlor zwei von zehn Jungtieren. Zwei der stereotypen Muttertiere verloren ihren kompletten Wurf. Eins gebar sechs Jungtiere, welche innerhalb von drei Tagen alle verendeten. Bei dem anderen Muttertier konnte keine Geburt beobachtet werden, eventuell aufgrund eines späten Aborts oder Kannibalismus.

5.2 Variabilität und Transmission stereotypen Verhaltens

Es gab individuelle Unterschiede in der Ausführung stereotypen Verhaltens während der Trächtigkeit. Zwei Muttertiere zeigten das *circuit running* bereits vor und während der Verpaarung, während der Trächtigkeit und ebenfalls *post partum*. Zwei Muttertiere übten *circuit running* vor der Verpaarung aus, reduzierten jedoch sehr stark die Intensität des stereotypen Verhaltens während der Trächtigkeit. Eines der beiden Muttertiere intensivierte das stereotype Verhalten wieder als die Jungen begannen selbstständig Nahrung aufzunehmen. Das andere Weibchen erhöhte den Grad der Stereotypie nach dem (nicht beobachteten) Werfen, siehe Abschnitt 5.1. Außerdem gab es zwei Tiere, die vor und während der Verpaarung und über die Trächtigkeit hinweg keine Stereotypie aufwiesen. Eines der beiden Muttertiere entwickelte stereotypes *circuit running* als die Jungtiere selbstständig begannen zu fressen, das andere Tier begann mit dem Ausüben von stereotypem *back flipping* als der Wurf abgesetzt wurde. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem stereotypen Verhalten des Muttertiers und der Entwicklung von Stereotypen bei den Nachkommen in der F₁-Generation gefunden werden. Jungtiere nicht-stereotyper Muttertiere entwickelten zu 37,05±14,80% Stereotypen, die Nachkommen stereotyper Muttertiere zeigten zu 44,20±15,89% ebenfalls stereotypes Verhalten.

5.3 Maternales Verhalten

Um bereits parentale Aspekte zu erfassen, die zu einer Entwicklung stereotypen Verhaltens bei Jungtieren in der F₁-Generation führen könnten, begann der Versuch mit der Beobachtung der mütterlichen Fürsorge (*maternal care*). Die Zuchtböcke wurden nach Reproduktionserfolg aus dem Zuchtkäfig entfernt. Das maternale Verhalten wurde über den Zeitraum von 21 Tagen *post partum* (Geburt von Jungtieren bis zum Absatz derer) mittels eines eigens entwickelten Protokolls erfasst (Kapitel 4.3.2). Jedes Tier wurde fünf Mal am Tag für eine halbe Stunde mit der Videokamera aufgezeichnet. Die Zeiten der Videoaufzeichnungen wurden in festgelegten Intervallen alle 7 Tage variiert. Innerhalb dieser halben Stunde wurde alle drei Minuten [z.B. 06.00, 06.03, 06.06, (...), 06.30 Uhr] anhand eines eigens entwickelten Protokoll das zu diesem Zeitpunkt gezeigte Verhalten erfasst. Daraus resultierend ergaben sich pro Muttertier 1155 Beobachtungszeitpunkte [21 Tage á 5x30 min (11 Beobachtungen in den 30 min) = 21x5x11 = 1155]. Die jeweils gezeigten Verhaltensweisen wurden prozentual errechnet. Hier dargestellt werden die Mittelwerte ±SD der stereotypen Muttertiere (n=4; schwarz) und nicht-stereotypen Muttertiere (n=4; weiß).

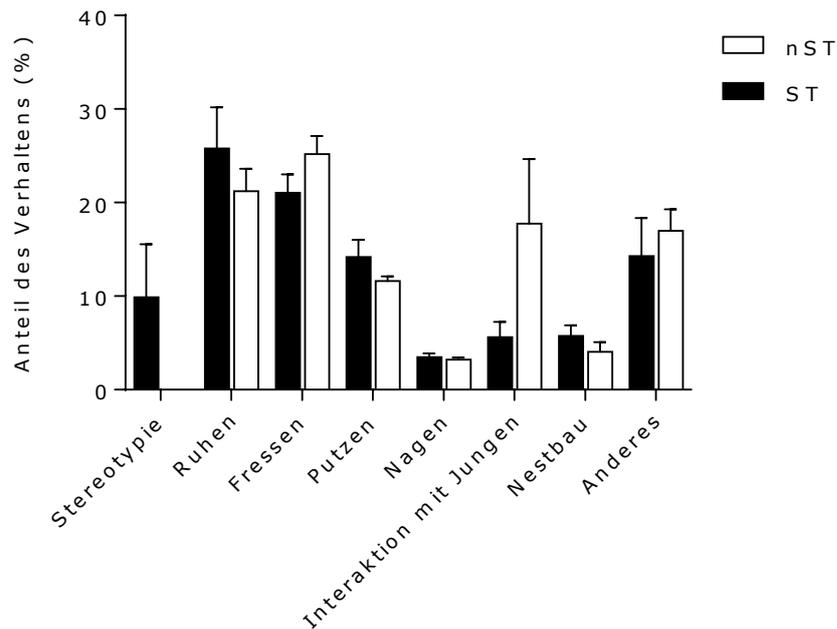


Abb. 5-1: Maternales Verhalten 1. Anteil der Stereotypie, des Ruhe-, Fress-, Putz- und Nageverhaltens, der Interaktion mit den Jungen, des Bearbeitens von Nestmaterial und anderem Verhalten der nicht-stereotypen (nST;n=4) und stereotypen (ST;n=4) Muttertiere in %, über den Zeitraum von 21 Tagen *post partum* gemittelt \pm SD. Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Bezüglich der in Abb. 5-1 dargestellten Verhaltensweisen fanden sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede. Die stereotypen Muttertiere (ST) verbrachten zusammengenommen über den Zeitraum von 21 Tagen $9,87 \pm 4,92\%$ mit stereotypem Verhalten, $25,79 \pm 4,39\%$ damit sich auszuruhen, $21,04 \pm 1,98\%$ mit dem Fressen, $14,17 \pm 1,85\%$ damit sich zu pflegen und zu putzen, $3,48 \pm 0,41\%$ Einstreu und Kotpellets zu benagen, $5,74 \pm 1,15\%$ Nestmaterial zu bearbeiten und $14,49 \pm 4,07\%$ mit Verhalten, das als „anderes“ klassifiziert wurde (trinken, graben, klettern, schnüffeln etc.). Im Vergleich dazu zeigten nicht-stereotype Muttertiere zu $21,22 \pm 2,38\%$ Ruhephasen, zu $25,20 \pm 1,92\%$ Fressverhalten, $11,60 \pm 0,50\%$ Pflege- und Putzverhalten, knabberten zu $3,21 \pm 0,24\%$, bearbeiteten Nestmaterial zu $4,04 \pm 1,05\%$ und zeigten zu $16,97 \pm 2,30\%$ „anderes“ Verhalten. Die Interaktion mit den Jungtieren bestand im Wesentlichen daraus, dass das Muttertier die Jungtiere getragen hat, sie gepflegt oder beleckt hat. Zwar zeigten nicht-stereotype Muttertiere erhöhte Levels an Interaktionen ($17,75 \pm 13,80\%$) im Vergleich zu stereotypen Muttertieren mit $5,63 \pm 3,26\%$, jedoch ist dieser Unterschied aufgrund der ausgeprägten Standardabweichung und der geringen Tieranzahl nicht signifikant. Zudem ist dieser Aspekt relativ unpräzise, denn erfasst wurde die Interaktion mit den Jungtieren nur, wenn es sicher festgestellt werden konnte. Befand sich ein Muttertier im Nest bei den Jungtieren, war es zwar im Kontakt zu den Jungtieren, eine direkte Interaktion konnte in den meisten Fällen vor dem Hintergrund des eingeschränkten Einblicks in das Nest jedoch nicht sicher festgestellt werden.

Zu den besagten Beobachtungszeitpunkten wurde zusätzlich zum detaillierten Erfassen des gezeigten Verhaltens der Aufenthaltsort des Muttertieres festgehalten (im Nest oder nicht) und detektiert ob es sich im Kontakt zu den Jungtieren befand oder sich abgesondert von ihnen im Käfig aufgehalten hat. Hier dargestellt sind wiederum die Daten der stereotypen Muttertiere (n=4; schwarz) und der nicht-stereotypen Muttertiere (n=4; weiß), prozentual als gemittelte Werte der Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 21 Tagen.

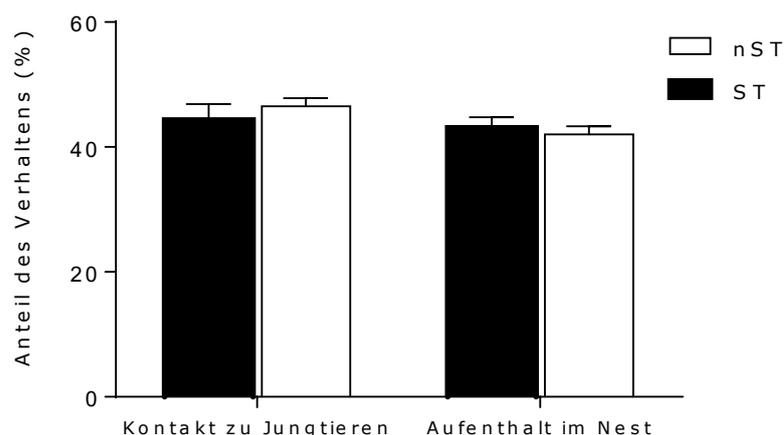


Abb. 5-2: Maternales Verhalten 2. Anteil in %, wie häufig sich die nicht-stereotypen (nST; n=4) und stereotypen (ST; n=4) Muttertiere im Nest bzw. im Kontakt mit den Jungtieren befanden, über den Zeitraum von 21 Tagen *post partum* gemittelt \pm SD. Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Nicht-stereotype Muttertiere befanden sich genauso häufig im Nest (nST: 42,01 \pm 1,30% vs. ST: 43,06 \pm 1,73%) und hatten genauso viel Kontakt zu ihren Jungtieren wie stereotype Muttertiere (nST: 46,54 \pm 1,27% vs. ST: 44,34 \pm 2,55%).

5.4 Nachzuchtverhalten

5.4.1 Entwicklung des stereotypen Verhaltens der Nachkommen

Insgesamt entwickelten 19 von 35 FVB/NJ Mäusen der F₁-Generation Stereotypien. Die Stereotypien wurden, wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben, definiert. Das stereotype *Circuit running* und *Back flipping* wurden dann als stereotyp definiert, wenn sie mindestens drei Mal nacheinander ausgeführt wurden, ohne Pausen zwischen den Verhaltensabläufen, die länger als drei Sekunden waren. Das *Wire gnawing* wurde als stereotyp definiert, wenn es über einen Zeitraum von mindestens zehn Sekunden wiederholt wurde und ohne Pausen, die länger als drei Sekunden waren, ausgeführt wurde.

Tabelle 5-2: Gruppeneinteilung der Nachkommen. Anzahl der Jungtiere mit den verschiedenen Formen der Stereotypen (*back flipping*, *circuit running*, *wire gnawing*) und Gruppeneinteilung (nST: nicht-stereotyp; ST: stereotyp), differenziert nach Geschlecht.

Versuchsgruppe	gesamt	weiblich	männlich
nST	16	7	9
ST	19	12	7
<i>back flipping</i>	10	4	6
<i>circuit running</i>	5	5	0
<i>wire gnawing</i>	4	3	1

Bei 53% der 19 stereotypen FVB/NJ-Mäuse konnte *back flipping* beobachtet werden, 26% zeigten *circuit running* und 21% *wire gnawing*. Den Hauptanteil der stereotypen Tiere bildeten mit 63% die Weibchen, im Gegensatz zu 37% stereotyper Männchen (Tabelle 5-2).

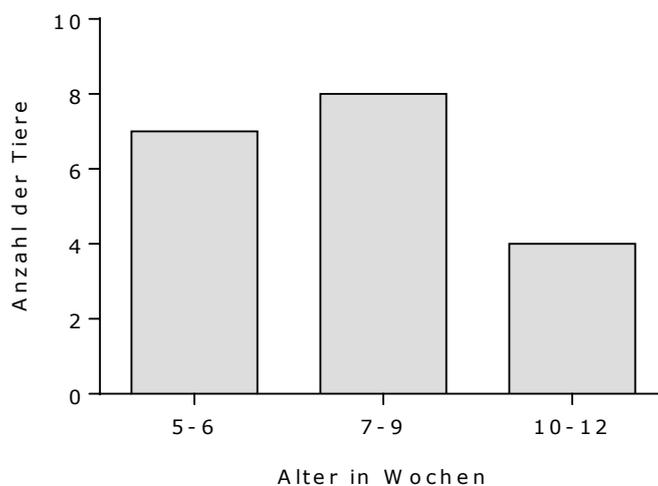


Abb. 5-3: Alter der Stereotypieentwicklung. Entwicklung des stereotypen Verhaltens jedes Tieres der Gruppe ST (stereotyp; n=19) entsprechend des Alters in Wochen.

Die FVB/NJ-Mäuse der Gruppe ST entwickelten die Stereotypen im Alter von fünf bis 12 Wochen, im Mittel mit 8 Wochen [$7,84 \pm 0,53$ (SD) Lebenswochen]. Bei einem Tier wurde stereotypes Verhalten erstmals im Alter von fünf Wochen festgestellt, bei sechs Tieren mit sechs Lebenswochen, bei vier Tieren mit sieben Wochen, bei drei Tieren mit acht Wochen, bei je einem Tier mit neun und mit elf Wochen und bei drei Tieren im Alter von 12 Wochen.

5.4.2 Aktivität und circadiane Rhythmik

Um den subjektiven Eindruck, dass stereotype Tiere vehement aktiver sind als nicht-stereotype, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmal detailliert erfasst, wie sich das Aktivitätsprofil stereotyper FVB/NJ-Mäuse gegenüber dem nicht-stereotyper FVB/NJ-Mäuse verhält. Die Aktivität ergibt sich aus der Summe aller aktiven Verhaltensweisen während der 12-Wochen-Beobachtung. Das Verhalten jedes Tier wurde fünf Mal pro Tag für 30 Minuten aufgezeichnet. Die Zeitpunkte der Aufzeichnung variierten nach 3 festgelegten 4-Wochen-Intervallen (Kapitel 4.3.3). Innerhalb jeder 30-minütigen Beobachtungszeit wurde alle drei Minuten das gezeigte Verhalten detektiert. Insgesamt ergaben sich pro Tier 4620 Beobachtungszeitpunkte [5x30 min pro Tag (11 Beobachtungen innerhalb 30 min) x 84 Tage = 5x11x84 = 4260 / Tier]. In Abb. 5-4 und Abb. 5-5 dargestellt wird der prozentuale Anteil der gesamten gezeigten Verhaltensweisen, gemittelt über die 12 Wochen, als Gruppenmittelwert für die stereotypen Tiere (schwarz; n=19) und die nicht-stereotypen Tiere (grau; n=16). In Abb. 5-4 sind die Verhaltensweisen, die zu den jeweiligen Uhrzeiten gezeigt wurden, dargestellt. Da die Intervalle alle 4 Wochen wechselten, ergaben sich pro Uhrzeit 1540 Beobachtungszeitpunkte pro Tier [5x30 min pro Tag (11 Beobachtungen innerhalb 30 min) x 28 Tage = 5x11x28 = 1540 / Tier /Uhrzeit]. Zusammengefasst wurden hier alle aktiven Verhaltensweisen („Aktivität“) und separat als grüne Linie wurde dargestellt wie viele der Beobachtungszeitpunkt (1540 / Tier /Uhrzeit) die Tiere damit verbracht haben, stereotypes Verhalten auszuüben (dargestellt als Gruppenmittelwert der stereotypen FVB/NJ Mäuse).

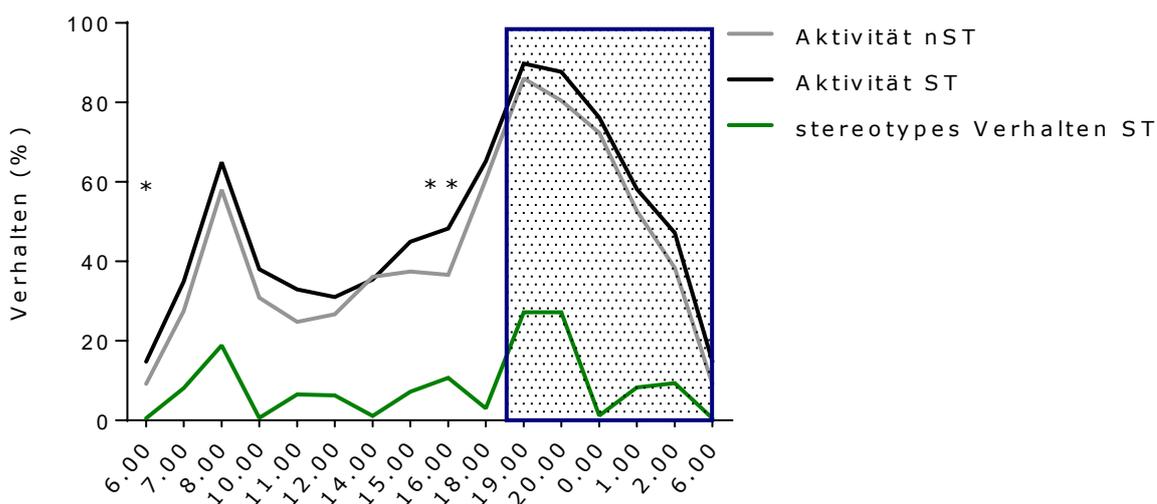


Abb. 5-4: Circadiane Rhythmik. Anteil der aktiven Verhaltensweisen (Mittelwert) in % der stereotypen (ST; n=19) und der nicht-stereotypen Tiere (nST; n=16) und der Anteil des stereotypen Verhaltens der stereotypen Tiere (ST; n=19) in Abhängigkeit von der Tageszeit, gemittelt über den Zeitraum der 12-wöchigen Beobachtung (Mann-Whitney-U-Test; *p≤0,05; ** p≤0,01). Der gepunktete und umrandete Bereich stellt die Dunkelphase in der Tierhaltung dar.

Stereotype und nicht-stereotype Mäuse zeigten vergleichbare Aktivitätsmuster bezüglich der circadianen Rhythmik. Wobei die stereotypen Tiere zu zwei Tageszeiten signifikant erhöhte Aktivitäten aufwiesen im Vergleich zu den nicht-stereotypen Tieren: um 06.00 Uhr (nST: $9,17 \pm 1,77\%$ vs. ST: $14,82 \pm 1,76\%$ aktiven Verhaltens; $p < 0,05$) und um 16.00 Uhr (nST: $36,60 \pm 2,63\%$ vs. ST: $48,32 \pm 3,29\%$ aktiven Verhaltens; $p < 0,01$). Das Ausüben stereotyper Verhaltensweisen geht mit dem generellen Aktivitätsprofil einher. Der höchste Anteil stereotypen Verhaltens ist zu Tageszeiten zu verzeichnen, in denen es dunkel in der Tierhaltung ist (19.00 Uhr: $27,21 \pm 0,03\%$; 20.00 Uhr: $27,22 \pm 0,04\%$ stereotypen Verhaltens). Zusätzlich ist ein Höhepunkt des stereotypen Verhaltens morgens um 08.00 Uhr zu finden ($18,86 \pm 0,03\%$ stereotypen Verhaltens).

Im Gegensatz zu Abb. 5-4, ist in Abb. 5-5 die Gesamtaktivität über den Beobachtungszeitraum von 12 Wochen für die nicht-stereotypen Tiere, die stereotypen Tiere insgesamt und die verschiedenen Typen der Stereotypen (*wire gnawing*, *back flipping*, *circuit running*) dargestellt. Der hier abgebildete Prozentwert des gezeigten Verhaltens ergibt sich also aus allen gezeigten aktiven Verhaltensweisen (graben, schnüffeln, klettern, fressen etc.) aus den 4620 Beobachtungszeitpunkten. Schwarz hinterlegt ist derjenige Anteil der Gesamtaktivität (%), den die Tiere mit dem Ausüben von stereotypem Verhalten verbracht haben.

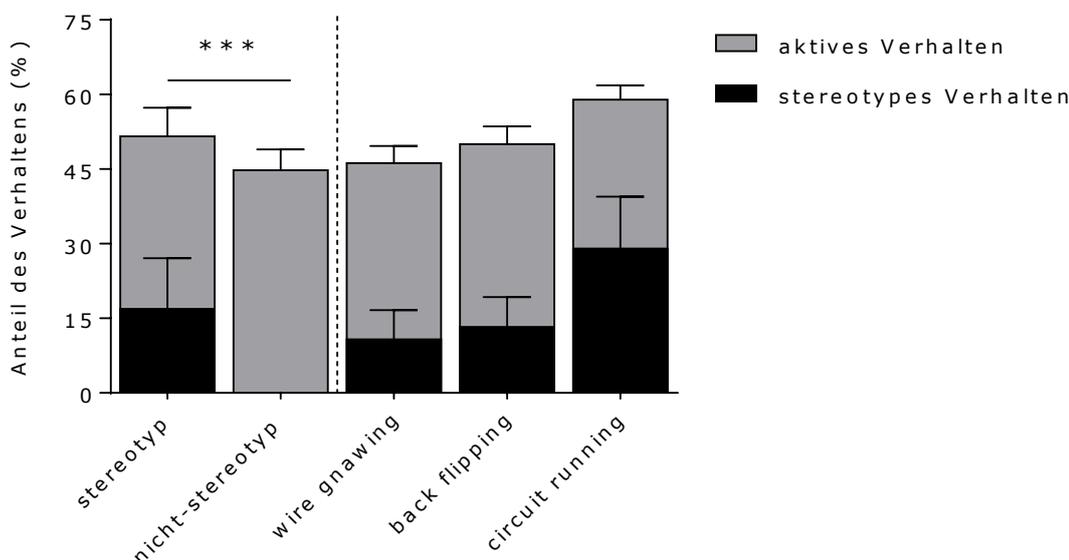


Abb. 5-5: Stereotypie- und Aktivitätslevel. Anteil des stereotypen Verhaltens (schwarz) an der Gesamtaktivität (grau) in % über den Zeitraum der 12-wöchigen Beobachtung, dargestellt für die nicht-stereotypen Tiere (n=16), die stereotypen Tiere (n=19) und die verschiedenen Formen der Stereotypen (*back flipping*; n=10, *circuit running*; n=5, *wire gnawing*; n=4) als Mittelwert \pm SEM (Mann-Whitney-U-Test; nur aktives Verhalten; *** $p \leq 0,005$).

Zusammengenommen, über den gesamten Zeitraum der 12-wöchigen Beobachtung, waren stereotype Tiere (ST) aktiver als nicht-stereotype Mäuse (nST) (nST: $44,78 \pm 1,04\%$ vs. ST: $51,56 \pm 1,32\%$; $p < 0,001$). Wobei Mäuse, die das *circuit running* ausübten am aktivsten waren ($58,97 \pm 1,30\%$; $p < 0,001$), gefolgt von *back flipping* Tieren ($50,01 \pm 1,12\%$) und *wire gnawing* Mäusen ($46,19 \pm 1,72\%$).

Die Zeit, die die Tiere mit der Ausführung stereotypen Verhaltens verbrachten, variierte je nach Typ der Stereotypen. Wie in Abb. 5-5 dargestellt, erzielten die *circuit running* Mäuse die höchsten Stereotypie-Level ($29,00 \pm 4,68\%$ der aktiven Zeit), verglichen mit Tieren, die *back flipping* ($13,30 \pm 1,89\%$ der aktiven Zeit) oder *wire gnawing* ($10,75 \pm 2,95\%$ der aktiven Zeit) entwickelten.

5.4.3 Detailliertes Verhalten der Nachkommen

Um Aussagen zum Wohlbefinden von Tieren treffen zu können, ist es essentiell deren Verhalten profund zu charakterisieren und präzise zu erfassen, wie sich das individuelle Verhaltensrepertoire darlegt. Das detaillierte Verhalten der Nachkommen wurde anhand von Videoaufnahmen mittels eigens entwickelten Protokolls über den Zeitraum von 12 Wochen ausgewertet (Kapitel 4.3.3). Jedes Tier wurde dabei 5x täglich je über einen Zeitraum von 30 Minuten gefilmt. Die Zeitpunkte der Videoaufnahmen variierten nach 3 festgelegten 4-Wochen-Intervallen. Innerhalb jeder 30 Minuten wurde alle drei Minuten das gezeigte Verhalten anhand eines eigens entwickelten Protokolls detektiert. Pro Tier ergaben sich somit über die 12 Wochen Beobachtungszeit 4260 Beobachtungszeitpunkte [$5 \times 30 \text{ min pro Tag (11 Beobachtungen innerhalb 30 min)} \times 84 \text{ Tage} = 5 \times 11 \times 84 = 4260 / \text{Tier}$]. In Tabelle 5-3 aufgelistet sind die prozentualen Anteile der 4260 Beobachtungszeitpunkte, die das jeweilige Tier mit den verschiedenen Verhaltensweisen verbracht hat, dargestellt als Gruppenmittelwerte \pm SEM für die nicht-stereotypen ($n=16$) und stereotypen ($n=19$) FVB/NJ-Mäuse. Als „Anderes“ wurden hier zusammengefasst: trinken, schnüffeln, laufen, Urinier- und Defäkationsverhalten.

Tabelle 5-3: Nachzuchtverhalten. Übersicht der Verhaltensweisen, die von den Nachkommen während der 12-wöchigen Beobachtung gezeigt wurden. Dargestellt für nicht-stereotype und stereotype Nachkommen als Anteil in % der gesamten gezeigten Verhaltensweisen, gemittelt für die jeweilige Gruppe über 12 Wochen \pm SEM (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,005$).

	Nicht-stereotyp (n=16)	Stereotyp (n=19)
Inaktivität	55,23 \pm 1,04	48,44 \pm 1,32***
Putzverhalten	13,50 \pm 0,48	14,63 \pm 0,50***
Fressverhalten	6,08 \pm 0,23	7,10 \pm 0,20**
Klettern	6,40 \pm 0,68	4,82 \pm 0,56*
Graben	3,26 \pm 0,14	2,74 \pm 0,16*
Sich aufstellen	3,27 \pm 0,23	2,75 \pm 0,19
Knabbern	4,31 \pm 0,17	3,65 \pm 0,18*
Bearbeiten von Nestmaterial	3,27 \pm 0,20	3,46 \pm 0,25
Anderes	4,66 \pm 0,28	3,34 \pm 2,21***
Stereotypes Verhalten	0,00 \pm 0,00	9,08 \pm 1,41

Neben Verhaltensweisen wie „sich aufstellen“ oder das Bearbeiten von Nestmaterial, wo es keine signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen gab, ist vor allen Dingen die Immobilität hervorzuheben. Stereotype FVB/NJ Mäuse verbrachten weniger Zeit damit zu ruhen oder zu schlafen. Darüber hinaus fraßen stereotype Tiere signifikant häufiger, verbrachten aber weniger Zeit damit zu klettern, graben oder knabbern. Außerdem zeigten nicht-stereotype Tiere mehr Verhaltensweisen, die als „andere“ klassifiziert wurden.

Die Daten bezüglich des Kletterns und „Anderes Verhalten“ waren nicht normalverteilt, demnach wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Bei allen anderen Verhaltensweisen wurde der T-Test für unabhängige Stichproben angewandt, da die Daten der Normalverteilung folgten.

5.5 Open Field Test

Das Open Field (deutsch: offenes Feld) impliziert eine unbekannte Situation und eine neue Umgebung für das Tier mit Gerüchen, Geräuschen und Lichtverhältnissen, mit denen es bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht konfrontiert wurde. Es ist eine validierte Methode, um ängstliches und exploratives Verhalten zu charakterisieren (Belzung and Griebel, 2001). Darüber hinaus kann das Raumnutzungsverhalten beurteilt werden und darüber Rückschlüsse auf die körperliche Fitness des Tieres gezogen werden. Das Open Field wurde an ein automatisiertes Aktivitätsüberwachungssystem (ANY-maze Version 4.99 m; Stoelting, Irland) gekoppelt. Durch diese Software wurde das Verhalten der Maus im Open Field erfasst und diverse Parameter erhoben. Der Open Field Test wurde pro Tier jeweils in Versuchswoche 10 (W10) und Versuchswoche 11 (W11) jeweils für fünf Minuten und in Versuchswoche 12 (W12) über den Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt (Kapitel 4.3.4).

5.5.1 Exploratives Verhalten

Um zu beurteilen, wie sich das Tier im Open Field verhielt, wurden die Zeiten ausgewertet, die das Tier in den verschiedenen Bereichen verbrachte. Das Open Field wurde dabei mit Hilfe der automatisierten Aktivitätsüberwachungssoftware (ANY-maze) in verschiedene Zonen unterteilt und die darin verbrachte Zeit automatisch detektiert. In Abb. 5-6 und Abb. 5-7 dargestellt sind die Gruppenmittelwerte der nicht-stereotypen (n=16) und stereotypen (n=19) FVB/NJ Mäuse.

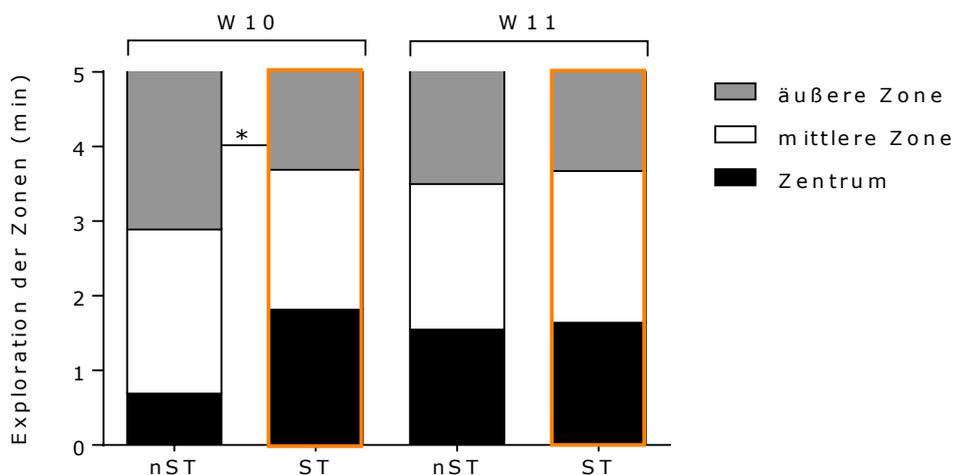


Abb. 5-6: Explorationsverhalten 1. Zeit in Minuten (von max. 5 min), die in den verschiedenen Zonen des Open Field Tests in Versuchswoche 10 (W10) und Versuchswoche 11 (W11) von den nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen Tieren (ST; n=19) verbracht wurde (Mann-Whitney-U-Test; * $p \leq 0,05$).

Im ersten Open Field Test verbrachten die nicht-stereotypen FVB/NJ Mäuse mehr Zeit die neue Umgebung zu explorieren. Während die Mäuse vergleichbare Zeiten in der mittleren Zone verbrachten (nST: $2,20 \pm 0,14$ vs. ST: $1,87 \pm 0,28$ min /5 min), hielten sich nicht-stereotype Mäuse während des ersten Tests weniger im Zentrum, also im Haus, auf (nST: $0,69 \pm 0,27$ vs. ST: $1,82 \pm 0,47$ min /5 min) und explorierten signifikant länger die äußere Zone (nST: $2,11 \pm 0,18$ vs. ST: $1,31 \pm 0,25$ min; $p < 0,05$). Diese Verhaltensunterschiede konnten im zweiten Open Field Test, in der darauffolgenden Woche, nicht mehr beobachtet werden (Zentrum: nST: $1,55 \pm 0,44$ vs. ST: $1,64 \pm 0,43$ min; mittlere Zone: nST: $1,95 \pm 0,25$ vs. ST: $2,03 \pm 0,28$ min; äußere Zone: nST: $1,50 \pm 0,21$ vs. ST: $1,33 \pm 0,23$ min/5 min).

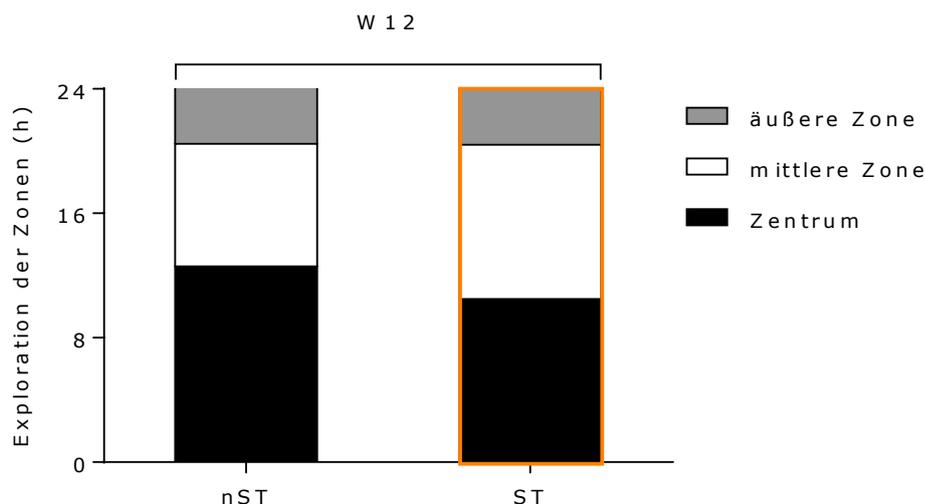


Abb. 5-7: Explorationsverhalten 2. Zeit in Stunden (von max. 24 h), die in den verschiedenen Zonen des Open Field Tests in Versuchswoche 12 (W12) von den nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen Tieren (ST; n=19) verbracht wurde. Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Im 24-stündigen Open Field Test in der Versuchswoche 12 verbrachten die Mäuse beider Versuchsgruppen annähernd gleich viel Zeit in den verschiedenen Bereichen des Open Fields. Während die Mäuse vergleichbare Zeiten in der mittleren Zone (nST: $7,88 \pm 0,54$ vs. ST: $9,91 \pm 0,89$ h/24 h) und in der äußeren Zone (nST: $3,54 \pm 0,36$ vs. ST: $3,59 \pm 0,27$ h/24 h) verbrachten, hielten sich stereotype FVB/NJ-Mäuse etwas weniger im Zentrum auf (nST: $12,59 \pm 0,80$ vs. ST: $10,49 \pm 0,97$ h/24 h), wengleich der Unterschied nicht signifikant war.

5.5.2 Aktivität

Die Aktivität wurde im 24-Stunden Open Field Test durch die ANY-maze Software automatisch bestimmt (Kapitel 4.3.4). Definiert wurde die Aktivität als Zeit, in der das Tier nicht inaktiv war. Als inaktiv wurde ein Tier dann detektiert, wenn es sich mindestens fünf Sekunden lang nicht bewegt hat.

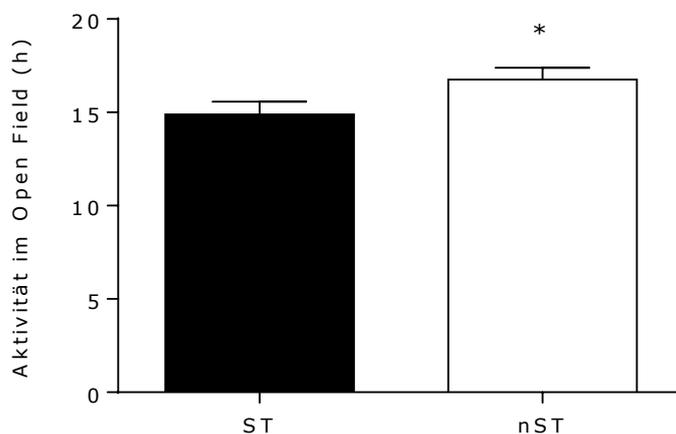


Abb. 5-8: Aktivität im Open Field. Zeit in Stunden, die die nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) Tiere während des dritten Open Field Tests (24 Stunden) aktiv verbracht haben, dargestellt als Mittelwert \pm SEM (Mann-Whitney-U-Test; * $p \leq 0,05$).

Die stereotypen Tiere ($16,75 \pm 0,62$ mobile Stunden/ 24h) waren signifikant aktiver als die nicht-stereotypen Mäuse ($14,89 \pm 0,66$ mobile Stunden/ 24h; $p < 0,05$). FVB/NJ-Mäuse, die das *Circuit running* ausübten, zeigten sich am aktivsten im 24 h Open Field mit $17,56 \pm 0,70$ mobilen Stunden/ 24h, gefolgt von *wire gnawing* Tieren mit $16,59 \pm 1,76$ mobilen Stunden/ 24h und *back flipping* Mäusen mit $16,27 \pm 3,67$ mobilen Stunden/ 24h.

5.5.3 Rotationen

Mit der Software konnte ebenfalls gemessen werden wie oft und in welche Richtung sich ein Tier um die eigene Körperachse drehte.

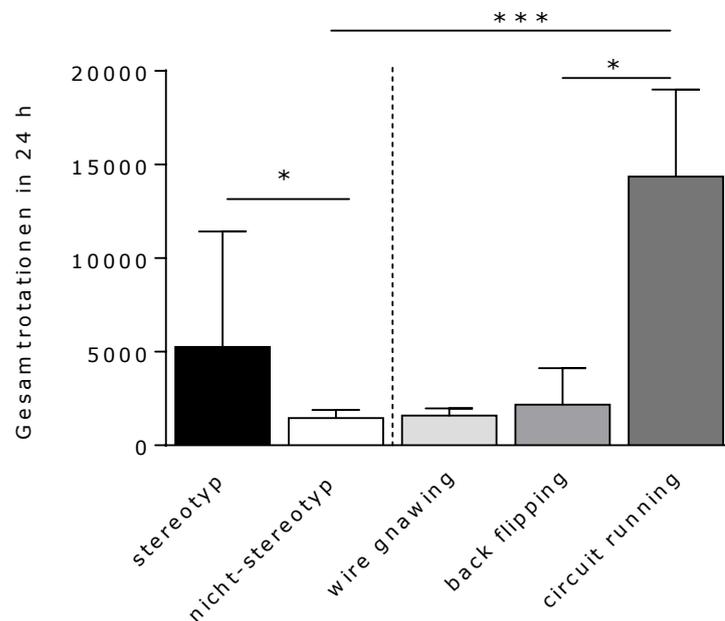


Abb. 5-9: Rotationen im Open Field. Rotationen um die eigene Körperachse während des dritten Open Field Tests (24 Stunden), dargestellt für die gesamten stereotypen Tiere (n=19), die nicht-stereotypen Tiere (n=16) und die verschiedenen Formen der Stereotypen (*back flipping*; n=10, *circuit running*; n=5, *wire gnawing*; n=4) als Mittelwert \pm SD (Kruskal-Wallis-Test; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,005$).

Stereotype Tiere drehten sich signifikant häufiger um die eigene Körperachse als nicht-stereotype Tiere (ST: 5263,42 \pm 1414,55 vs. nST: 1458,56 \pm 106,45 Rotationen in 24 Stunden; $p < 0,05$). Wobei sich *circuit running* Mäuse (14365,00 \pm 2079,81 Rotationen in 24 h) am meisten von den nicht-stereotypen Tieren unterschieden ($p < 0,05$), gefolgt von Mäusen, die *back flipping* ausübten (2179,20 \pm 617,37 Rotationen in 24 h) und *wire gnawing* Tieren (1597,00 \pm 188,32 Rotationen in 24 h).

Daraus errechnet wurde, wie in Abb. 5-10 dargestellt, der prozentuale Anteil der Rotationen im Uhrzeigersinn bzw. entgegen des Uhrzeigersinns an der Anzahl der Gesamtrotationen, gemittelt als Gruppenmittelwerte.

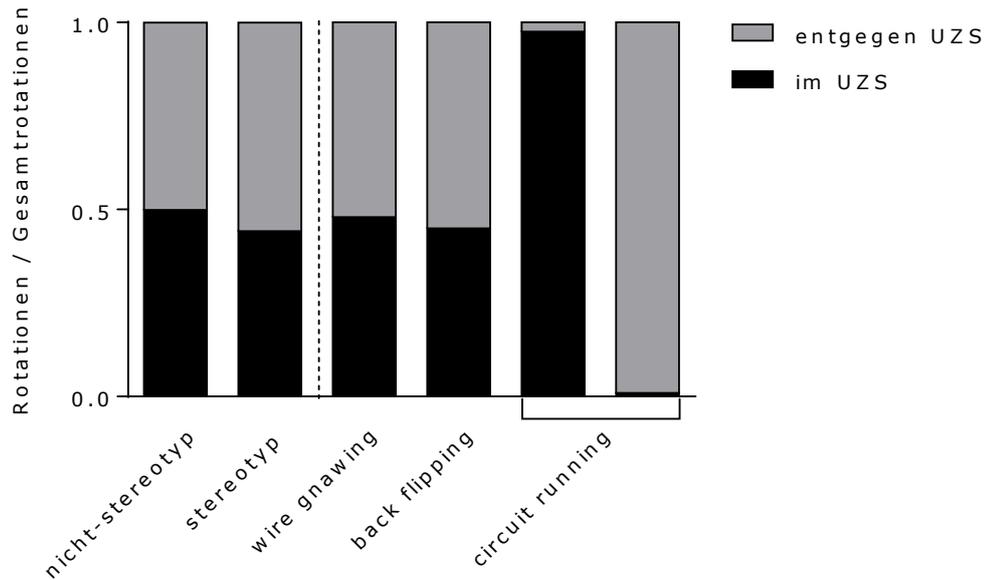


Abb. 5-10: Seitenpräferenzen der Rotationen. Anteil der Rotationen im Uhrzeigersinn (schwarz; im UZS) und entgegen des Uhrzeigersinns (grau; entgegen UZS) relativ zu der Anzahl der Gesamtrotationen während des dritten Open Field Tests (24 Stunden), dargestellt für die nicht-stereotypen ($n=16$) und die gesamten stereotypen ($n=19$) Tiere und die verschiedenen Formen der Stereotypien (*back flipping*; $n=10$, *circuit running*; $n=5$, *wire gnawing*; $n=4$).

Außerdem zeigten *circuit running* Mäuse, und zwei der *back flipping* Mäuse, klare Seitenpräferenzen (Abb. 5-10). Sie liefen entweder zu annähernd 100% im Uhrzeigersinn (*circuit running* $n=2$) oder entgegen des Uhrzeigersinns (*circuit running* $n=3$; *back flipping* $n=2$), wohingegen die nicht-stereotypen Mäuse ($n=16$), die *wire gnawing* ($n=4$) Mäuse und die übrigen *back flipping* ($n=8$) Tiere ihre Richtung zu annähernd 50% variierten.

5.5.4 Zurückgelegte Distanzen

Unter Angabe der Maße des Open Fields konnte die Software ermitteln, welche Wegstrecke die Tiere in 24 Stunden abgelaufen haben.

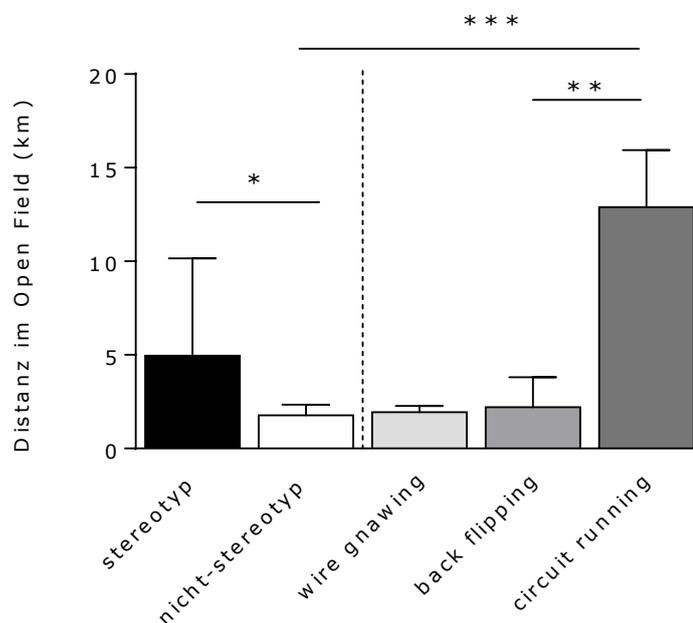


Abb. 5-11: Distanzen im Open Field. Zurückgelegte Distanz in km während des dritten Open Field Tests (24 Stunden), dargestellt für die nicht-stereotypen (n=16) und die stereotypen Tiere gesamt (n=19) und die verschiedenen Formen der Stereotypen (*back flipping*; n=10, *circuit running*; n=5, *wire gnawing*; n=4) als Mittelwert \pm SD (Kruskal-Wallis-Test; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$).

Mäuse, die stereotypes *circuit running* ausübten, liefen hier $12,89 \pm 1,37$ km/ 24h, also signifikant mehr im Vergleich zu *back flipping* Mäusen mit $2,21 \pm 0,51$ km/ 24h ($p < 0,05$) und nicht-stereotypen Mäusen mit $1,77 \pm 0,14$ km/ 24h ($p < 0,005$) und mehr als *wire gnawing* Mäuse mit $1,94 \pm 0,17$ km/ 24h, wenn auch der Unterschied nicht signifikant ist.

5.5.5 Geschwindigkeiten

Unter Angabe der Maße des Open Fields konnte die Software ermitteln mit welcher Durchschnitts- und Maximalgeschwindigkeit sich die Tiere fortbewegt haben.

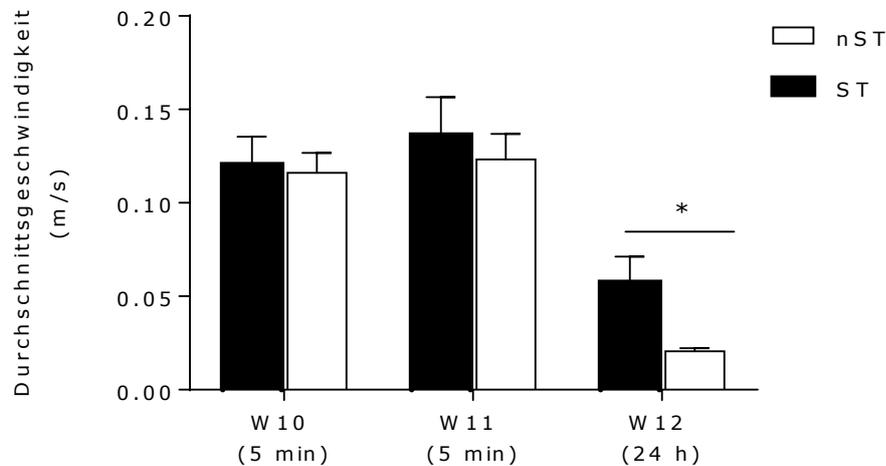


Abb. 5-12: Durchschnittsgeschwindigkeit. Durchschnittsgeschwindigkeit in m/s der nicht-stereotypen (nST; n=16) und der stereotypen (ST; n=19) Tiere während des ersten Open Field Tests in Versuchswoche 10 (W10), Versuchswoche 11 (W11) und Versuchswoche 12 (W12), dargestellt als Mittelwert \pm SEM (Mann-Whitney-U-Test; * $p \leq 0,05$).

Die Tiere beider Gruppen bewegten sich während des ersten Open Field Tests in Woche 10 (nST: $0,12 \pm 0,01$ vs. ST: $0,12 \pm 0,02$ m/s) und während des zweiten Tests in Woche 11 (nST: $0,12 \pm 0,01$ vs. ST: $0,14 \pm 0,02$ m/s) mit annähernd gleicher Durchschnittsgeschwindigkeit fort. Während des dritten Open Field Tests, der über den Zeitraum von 24 Stunden lief, erreichten die nicht-stereotypen Mäuse eine Durchschnittsgeschwindigkeit von $0,02 \pm 0,00$ m/s, also signifikant weniger als die stereotypen Tiere mit $0,06 \pm 0,01$ m/s ($p > 0,05$).

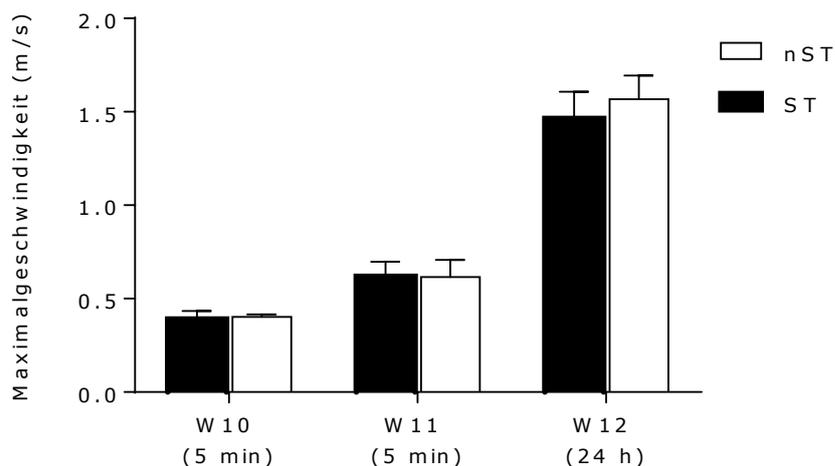


Abb. 5-13: Maximalgeschwindigkeit. Maximalgeschwindigkeit in m/s der nicht-stereotypen (nST; n=16) und der stereotypen (ST; n=19) Tiere während des ersten Open Field Tests in Versuchswoche 10 (W10), Versuchswoche 11 (W11) und Versuchswoche 12 (W12), dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Die nicht-stereotypen und die stereotypen Mäuse erzielten in etwa die gleichen Maximalgeschwindigkeiten während des ersten und zweiten Open Field Tests (W10: nST: $0,40 \pm 0,01$ vs. ST: $0,39 \pm 0,04$ m/s; W11: nST: $0,62 \pm 0,09$ vs. ST: $0,62 \pm 0,08$ m/s). Während des dritten Open Field Tests, über den Zeitraum von 24 Stunden, erreichten die nicht-stereotypen Tiere eine Maximalgeschwindigkeit von $1,57 \pm 0,13$ m/s und die stereotypen Tiere $1,46 \pm 0,14$ m/s.

5.6 Indirekte Tierkalorimetrie

In der Versuchswoche 12 wurden die Tiere in die Messeinrichtung der ITK verbracht. Die Maße der Käfige in der ITK sind denen der *Home Cages*, in denen die Tiere während des gesamten Versuchs gehalten wurden, nahezu identisch. Ziel der hier generierten Daten war es, zu erfassen wie viel Distanz die Tiere auf der Fläche des für sie gewohnten Käfigs zurücklegen und diese Daten mit den zurückgelegten Wegstrecken im Open Field (vermehrtes Platzangebot) zu vergleichen.

5.6.1 Zurückgelegte Distanzen

In den Käfigen der ITK sind spezielle Infrarotschranken installiert, anhand derer die mit der Messeinrichtung verbundene Software genau ermitteln kann, welche Distanzen die Tiere zurückgelegt haben (Kapitel 4.3.5).

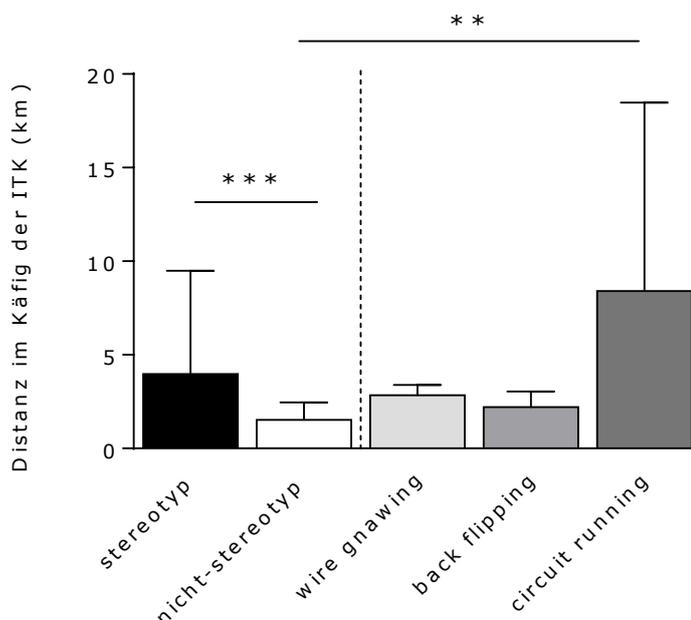


Abb. 5-14: Distanzen in der ITK. Zurückgelegte Distanz in km in der ITK (24 Stunden), dargestellt für die nicht-stereotypen (n=16) Tiere, die stereotypen Tiere gesamt (n=19) und die verschiedenen Formen der Stereotypen (*back flipping*; n=10, *circuit running*; n=5, *wire gnawing*; n=4) als Mittelwert \pm SD (Kruskal-Wallis-Test; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$).

Hier liefen die *circuit running* Tiere im Durchschnitt $8,40 \pm 4,51$ km/24h, also signifikant mehr als nicht-stereotype Mäuse mit $1,53 \pm 0,23$ km/24h ($p < 0,01$) und nicht signifikant mehr als *wire gnawing* ($2,84 \pm 0,28$ km/24h) und *back flipping* Mäuse ($2,22 \pm 0,26$ km/24h).

Außerdem gab es keine gruppenabhängigen signifikanten Unterschiede der zurückgelegten Distanzen in der Arena des Open Fields (Abb. 5-11) verglichen mit den zurückgelegten Distanzen in den Käfigen der ITK (Abb. 5-14).

5.6.2 Futter- und Wasseraufnahme

Um die physische Aktivität und die Körpergewichtsentwicklung relativieren zu können, wurden über spezielle Futterraufen und Tränkeinrichtungen, die mit Hängewaagen versehen waren, ebenfalls die Futter- und Trinkwasseraufnahme während der Messperiode in der ITK erfasst.

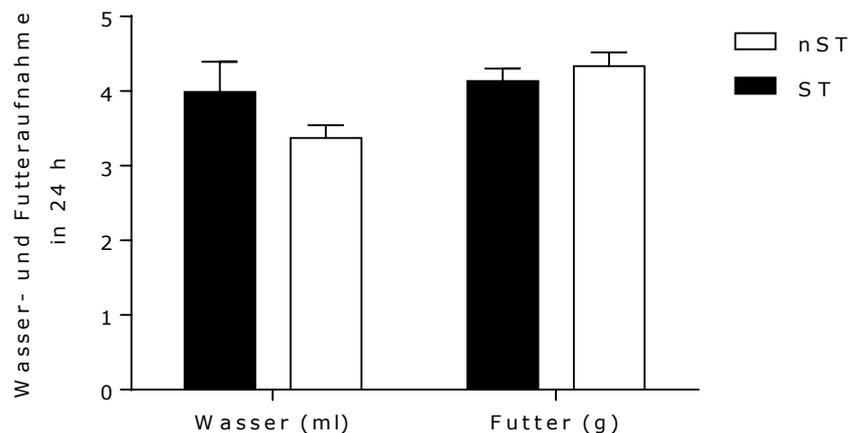


Abb. 5-15: Fress- und Trinkverhalten. Wasseraufnahme in ml und Futterverbrauch in g der nicht-stereotypen (nST; Futter: n=16, Wasser: n=15) und stereotypen (ST; Futter: n=16, Wasser: n=13) Tiere in der Messeinrichtung der ITK in der Versuchswoche 12, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Mann-Whitney-U-Test (Wasseraufnahme) bzw. T-Test (Futteraufnahme) ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Es konnten keine Unterschiede in der Futteraufnahme zwischen nicht-stereotypen Mäusen mit $4,33 \pm 0,19$ g/Tier/Tag (n=16) und stereotypen Mäusen mit $4,13 \pm 0,17$ g/Tier/d (n=16) festgestellt werden. Auch die Trinkwasseraufnahme unterschied sich nicht (nST: $3,37 \pm 0,17$; n=15 vs. ST: $3,99 \pm 0,41$; n=13). Jedoch gab es signifikante Unterschiede zwischen den Tieren, die die verschiedenen Formen stereotypen Verhaltens ausgeübt haben. Tiere, die *circuit running* zeigten (n=5), nahmen $5,38 \pm 1,39$ ml/Tag Wasser zu sich, also signifikant mehr als nicht-stereotype ($p < 0,05$) und signifikant mehr als *back flipping* (n=7) FVB/NJ-Mäuse mit $2,98 \pm 0,66$ ml/Tag ($p < 0,05$), jedoch nicht mehr als *wire gnawing* (n=4) Tiere mit $3,35 \pm 0,31$ ml/Tag. Bei der Futteraufnahme ergaben sich keine Gruppenunterschiede. Hier nahmen *circuit running* FVB/NJ's (n=5) $4,56 \pm 0,54$ g/Tag zu sich, demnach etwas mehr als *wire gnawing* Tiere (n=3) mit $4,12 \pm 0,71$ g/Tag und als *back flipping* Mäuse (n=5) mit $3,84 \pm 0,64$ g/Tag.

Die Futterraufen sind spezielle, im Käfig hängende, sich bei Berührung leicht bewegende Raufen, die im unteren Bereich mit einer Auffangeinrichtung für Futterreste versehen sind. Die Tränken sind mit Nippeln ausgestattet, die das Auslaufen von Wasser verhindern sollen. Diese müssen durch die Maus während des Trinkens etwas zur Seite positioniert werden

und unterscheiden sich in dem Punkt von den Tränkeinrichtungen im Haltungskäfig. Da sie sich nicht an die speziellen Futtereinrichtungen und Wasserflaschen gewöhnt haben, mussten sieben Tiere (6 stereotype und 1 nicht-stereotypes) von der Futteraufnahmemessung und drei Tiere (alle stereotyp) von der Erfassung der Trinkwasseraufnahme ausgeschlossen werden.

5.7 Körpergewichtsentwicklung

Das Körpergewicht wurde vom Absatz an über den gesamten Zeitraum der Studie wöchentlich erfasst.

Tabelle 5-4: Geschlechterabhängige Körpergewichtsentwicklung. Mittleres Körpergewicht in g, dargestellt als Mittelwert \pm SEM, der nicht-stereotypen und stereotypen Tiere, getrennt nach Geschlecht, vom Absatz bis zur Versuchswoche 12 (W1, [...], W12), ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (Einfaktorielle Varianzanalyse; $p \leq 0,05$).

	Nicht-stereotyp		Stereotyp	
	Weibchen n=7	Männchen n=9	Weibchen n=12	Männchen n=7
Absatz	16,50 \pm 0,50 ^{a,c}	13,38 \pm 0,53 ^{a,b,c}	12,50 \pm 0,61 ^{b,c}	13,19 \pm 0,50 ^{a,b}
W1	21,50 \pm 0,32 ^{a,c}	21,16 \pm 0,89 ^{a,c}	18,17 \pm 0,54 ^b	20,80 \pm 1,01 ^{a,b,c}
W2	23,20 \pm 0,16 ^{a,c}	25,09 \pm 0,72 ^{a,c}	21,03 \pm 0,73 ^b	25,07 \pm 0,73 ^{a,b,c}
W3	23,74 \pm 0,35 ^{a,c}	26,99 \pm 0,65 ^{a,c}	21,91 \pm 0,77 ^b	26,70 \pm 0,86 ^{a,b,c}
W4	24,89 \pm 0,36 ^{a,c}	27,84 \pm 0,95 ^{a,c}	22,78 \pm 0,95 ^b	28,41 \pm 1,00 ^{a,b,c}
W5	26,54 \pm 0,50 ^{a,c}	29,17 \pm 1,08 ^{a,c}	23,14 \pm 0,98 ^b	29,63 \pm 1,17 ^{a,b,c}
W6	27,44 \pm 0,66 ^{a,c}	31,58 \pm 1,06 ^{a,c}	21,99 \pm 0,61 ^b	30,23 \pm 1,35 ^{a,b,c}
W7	27,23 \pm 0,75 ^{a,c}	31,94 \pm 1,18 ^{a,c}	22,82 \pm 0,59 ^b	30,86 \pm 1,46 ^{a,b,c}
W8	26,51 \pm 0,25 ^{a,c}	33,40 \pm 0,85 ^{a,c}	23,57 \pm 0,42 ^b	31,93 \pm 1,46 ^{a,b,c}
W9	27,33 \pm 0,43 ^{a,c}	34,71 \pm 1,12 ^{a,c}	23,81 \pm 0,64 ^b	33,00 \pm 1,51 ^{a,b,c}
W10	26,99 \pm 0,35 ^{a,c}	34,78 \pm 1,06 ^{a,c}	23,86 \pm 0,52 ^b	32,83 \pm 1,57 ^{a,b,c}
W11	27,54 \pm 0,47 ^{a,c}	34,42 \pm 0,88 ^{a,c}	24,08 \pm 0,57 ^b	33,14 \pm 1,52 ^{a,b,c}
W12	28,41 \pm 0,58 ^{a,c}	34,23 \pm 1,07 ^{a,c}	24,52 \pm 0,49 ^b	32,77 \pm 1,50 ^{a,b,c}

Es konnten geschlechterabhängige Körpergewichtsentwicklungen festgestellt werden, wobei vor allem stereotype Weibchen, außer beim Absatz, kontinuierlich weniger wogen als nicht-stereotype weibliche FVB/NJ-Mäuse ($p \leq 0,05$). Stereotype Männchen wogen ebenfalls weniger als nicht-stereotype FVBN/J-Männchen, wobei der Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant war.

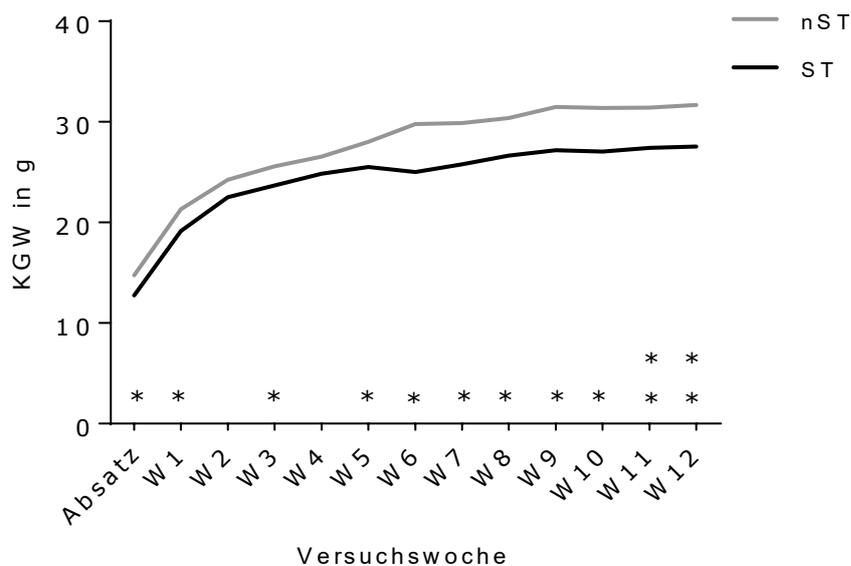


Abb. 5-16: Gruppenabhängige Körpergewichtsentwicklung. Mittleres Körpergewicht in g, dargestellt als Mittelwert, der nicht-stereotypen (grau; n=16) und stereotypen Tiere (schwarz; n=19), vom Absatz bis zur Versuchswoche 12 (W1, [...], W12), T-Test unabhängiger Stichproben (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Zusammengenommen unterschieden sich die Körpergewichte nicht-stereotyper FVB/NJ-Mäuse von denen stereotyper FVB/NJ-Mäuse beim Absetzen, in Versuchswoche 1, Versuchswoche 3, Versuchswoche 5-10 (* $p \leq 0,05$) und in den Versuchswochen 11-12 (** $p \leq 0,01$). Wobei sich die Tiere, die das circuit running ausführten, am meisten hinsichtlich der Körpergewichtsentwicklung von nicht-stereotypen FVB/NJ-Mäusen unterschieden ($p \leq 0,05$; Tabelle H-2 im Anhang H.2).

5.8 Körperzusammensetzung

Ziel dieser Bestimmung war es, die Körpergewichtsentwicklung genauer definieren zu können und zu evaluieren, ob es eine Art „Trainingseffekt“ durch die gesteigerte körperliche Betätigung stereotyper FVB/NJ-Mäuse gibt. Außerdem komplettiert diese Messung die Erstellung eines „metabolischen Profils“ der FVB/NJ-Mäuse, das bis zu diesem Zeitpunkt nicht existierte. Die Körperzusammensetzung wurde beim Absatz, in Versuchswoche 7 und Versuchswoche 12 mittels NMR erfasst.

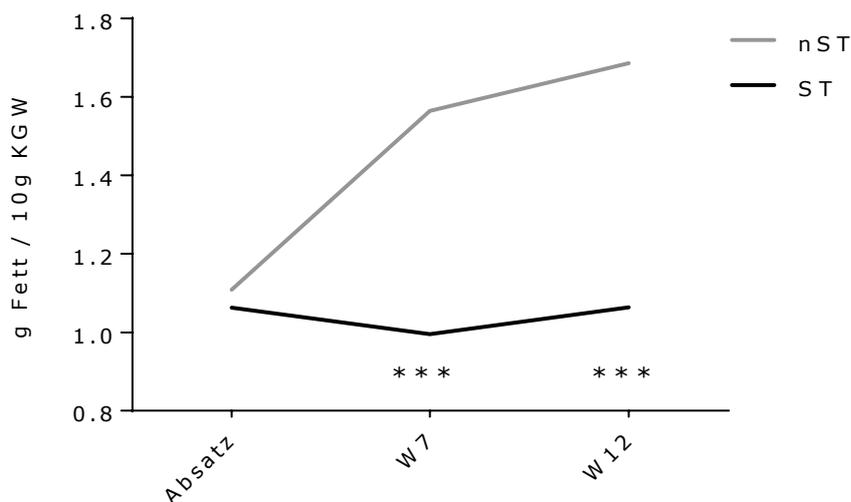


Abb. 5-17: Körperfettanteil. Fettanteil (Mittelwert) in g/ 10 g Körpergewicht (KGW) der nicht-stereotypen (nST) und stereotypen (ST) Tiere im Absatzalter, in der Versuchswoche 7 (W7) und Versuchswoche 12 (W12), (T-Test unabhängiger Stichproben; *** $p \leq 0,005$).

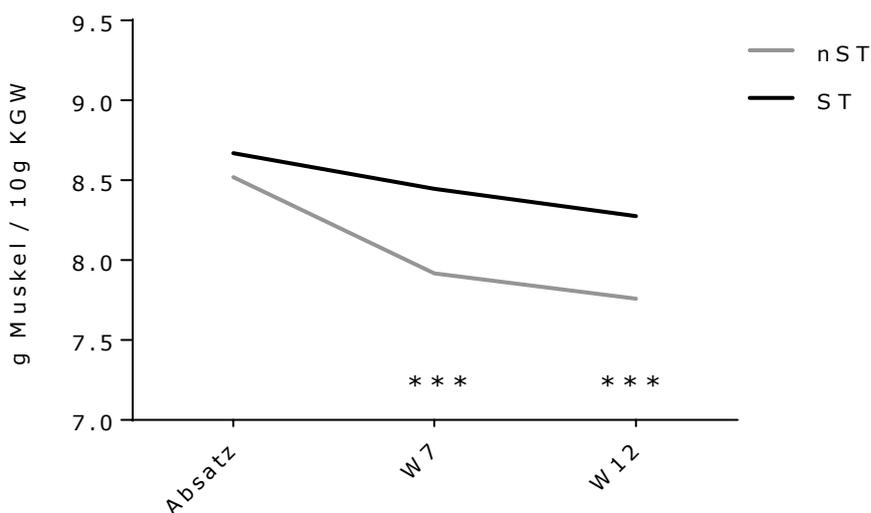


Abb. 5-18: Körpermuskelanteil. Muskelanteil (Mittelwert) in g/ 10 g Körpergewicht (KGW) der nicht-stereotypen (nST) und stereotypen (ST) Tiere im Absatzalter, in der Versuchswoche 7 (W7) und Versuchswoche 12 (W12), (T-Test unabhängiger Stichproben; *** $p \leq 0,005$).

Im Absatzalter unterschieden sich die Tiere nicht in ihrer Körperzusammensetzung (nST: $1,11 \pm 0,04$ vs. ST: $1,06 \pm 0,05$ g Fett/10 g KGW und nST: $8,52 \pm 0,06$ vs. ST: $8,67 \pm 0,07$ g Muskel/g 10 g KGW). Verglichen mit nicht-stereotypen Mäusen, bestanden die Körper der stereotypen Mäuse allerdings aus mehr Muskulatur und weniger Fett in Versuchswoche 7 (nST: $1,56 \pm 0,06$ vs. ST: $1,00 \pm 0,10$ g Fett/10 g KGW und nST: $7,92 \pm 0,04$ vs. ST: $8,45 \pm 0,09$ g Muskel/10 g KGW; $p < 0.005$) und am Ende der Versuchswoche 12 (nST: $1,69 \pm 0,08$ vs. ST: $1,06 \pm 0,11$ g Fett/10 g KGW und nST: $7,76 \pm 0,08$ vs. ST: $8,28 \pm 0,10$ g Muskel/10 g KGW; $p < 0.005$).

Detaillierte Daten zu den verschiedenen Typen des stereotypen Verhaltens befinden sich in Tabelle H-2 im Anhang H.2.

5.9 Körperlänge, Organgewichte

5.9.1 Körperlänge

Die Körperlänge wurde einmalig, final ermittelt (Kapitel 4.3.12). Gemessen wurde hierbei die Länge des Körpers von der Nasenspitze des Tieres bis zur Schwanzwurzel bzw. bis zur Schwanzspitze.

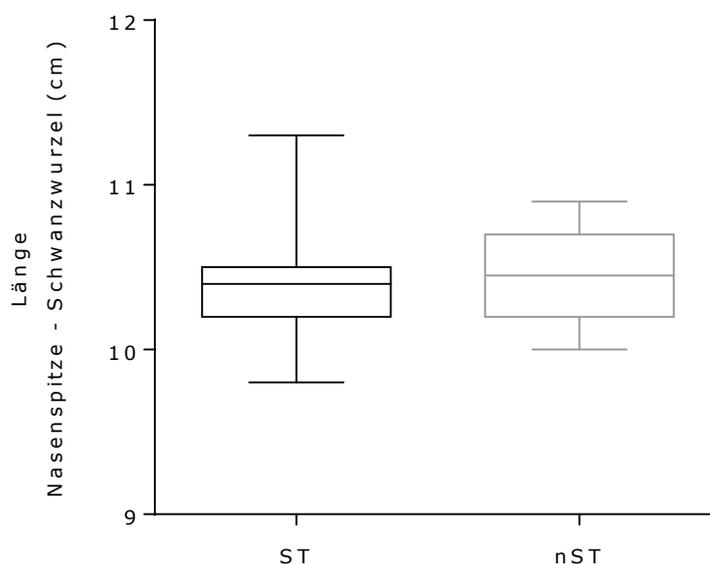


Abb. 5-19: Körperlänge 1. Länge der nicht-stereotypen (nST; $n=16$) und stereotypen (ST; $n=19$) Tieren in cm, gemessen von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel. Dargestellt als Boxplot. Box kennzeichnet Interquartilsabstand (unteres Quartil bei 25%, Median bei 50% und oberes Quartil bei 75%). Striche stellen 2,5% bzw. 97,5% Perzentil dar. T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Wie die Abb. 5-19 zeigt, sind die nicht-stereotypen und stereotypen Mäuse gemessen von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel annähernd gleich groß (nST: $10,47 \pm 0,07$ vs. ST: $10,37 \pm 0,08$ cm). Auch zwischen den Tieren der verschiedenen Typen der Stereotypien gibt es keine signifikanten Unterschiede (*back flipping*; $n=10$; $10,43 \pm 0,42$ vs. *circuit running*; $n=5$; $10,26 \pm 0,13$ vs. *wire gnawing*; $n=4$; $10,38 \pm 0,30$ cm).

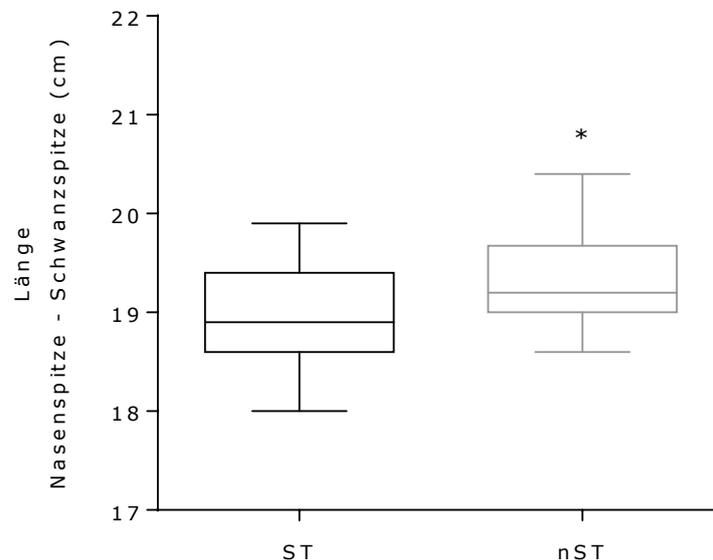


Abb. 5-20: Körperlänge 2. Länge der nicht-stereotypen (nST; $n=16$) und stereotypen (ST; $n=19$) Tieren in cm, gemessen von der Nasenspitze bis zur Schwanzspitze. Dargestellt als Boxplot. Box kennzeichnet Interquartilsabstand (unteres Quartil bei 25%, Median bei 50% und oberes Quartil bei 75%). Striche stellen 2,5% bzw. 97,5% Perzentil dar; T-Test unabhängiger Stichproben ($*p \leq 0,05$).

Betrachtet man die Gesamtlänge von der Nasenspitze bis zur Schwanzspitze, ergaben sich hier allerdings Unterschiede. Nicht-stereotype Tiere erreichten hier eine Gesamtlänge von $19,36 \pm 0,11$ cm. Sie waren also verglichen mit stereotypen Tieren mit $18,99 \pm 0,12$ cm signifikant größer ($p \leq 0,05$; Abb. 5-20). Zwischen den Tieren der verschiedenen Typen der Stereotypien gibt es keine signifikanten Unterschiede (*back flipping*; $n=10$; $19,09 \pm 0,52$ vs. *circuit running*; $n=5$; $18,76 \pm 0,47$ vs. *wire gnawing*; $n=4$; $19,03 \pm 0,60$ cm). Trägt man die Daten der beiden Messungen zusammen, lässt sich demnach sagen, dass sich der Körper der Tiere bis zur Schwanzwurzel nicht zwischen nicht-stereotypen und stereotypen FVB/NJ-Mäusen unterscheidet. Misst man allerdings die Gesamtlänge der Tiere bis zur Schwanzspitze, ergeben sich signifikante Unterschiede. Demzufolge haben nicht-stereotype FVB/NJ-Mäuse längere Schwänze im Vergleich zu nicht-stereotypen FVB/NJ-Mäusen.

5.9.2 Organgewichte

Nach Entnahme wurde jedes der folgenden Organe vor der Weiterverarbeitung gewogen und so Indikatoren für weitere Analysen gesammelt.

Tabelle 5-5: Organgewichte. Relative Organgewichte von Herz, Leber, Milz, Gehirn und braunem Fettgewebe (BAT), dargestellt als Mittelwert (%) vom Körpergewicht \pm SEM, getrennt nach Gruppen (nicht-stereotyp, stereotyp) und Geschlecht; n.s. (nicht-signifikant).

Organ	Nicht-stereotyp		Stereotyp		Signifikanz	
	Weibchen n=7	Männchen n=9	Weibchen n=12	Männchen n=7	Stereotypie	Geschlecht
Herz	0,43 \pm 0,02	0,50 \pm 0,02	0,43 \pm 0,01	0,46 \pm 0,02	p<0,005	n.s.
Leber	5,25 \pm 0,11	5,84 \pm 0,16	4,92 \pm 0,16	5,40 \pm 0,11	p<0,005	p<0,05
Milz	0,38 \pm 0,01	0,47 \pm 0,04	0,31 \pm 0,01	0,34 \pm 0,03	p<0,05	p<0,005
Gehirn	1,48 \pm 0,09	1,70 \pm 0,09	1,36 \pm 0,02	1,45 \pm 0,13	p<0,05	p<0,05
BAT	0,52 \pm 0,04	0,56 \pm 0,05	0,56 \pm 0,07	0,73 \pm 0,06	n.s.	p<0,05

Bei der finalen Sektion ergaben sich signifikante Unterschiede in den relativen Herz-, Leber-, Milz- und Gehirngewichten. Alle relativen Gewichte der genannten Organe waren bei stereotypen Tieren signifikant höher. Das relative Gewicht des braunen Fettgewebes ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen nicht-stereotypen und stereotypen Tieren. Außerdem ließen sich bei allen Organen, außer beim Herzen geschlechterabhängige Unterschiede der Organgewichte nachweisen, wobei die männlichen Tiere bei allen Organen höhere relative Gewichte als die Weibchen aufwiesen.

Die Daten zum relativen Milzgewicht verhielten sich nicht normalverteilt, demnach wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Die Daten der anderen relativen Organgewichte wurden aufgrund der Normalverteilung der Daten anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet.

Das relative Gewicht des Herzens wurde bestimmt, da es sich hierbei um das vornehmliche Herz-Kreislauf-Organ handelt. Die Leber wurde als zentrales Stoffwechselorgan ausgewählt.

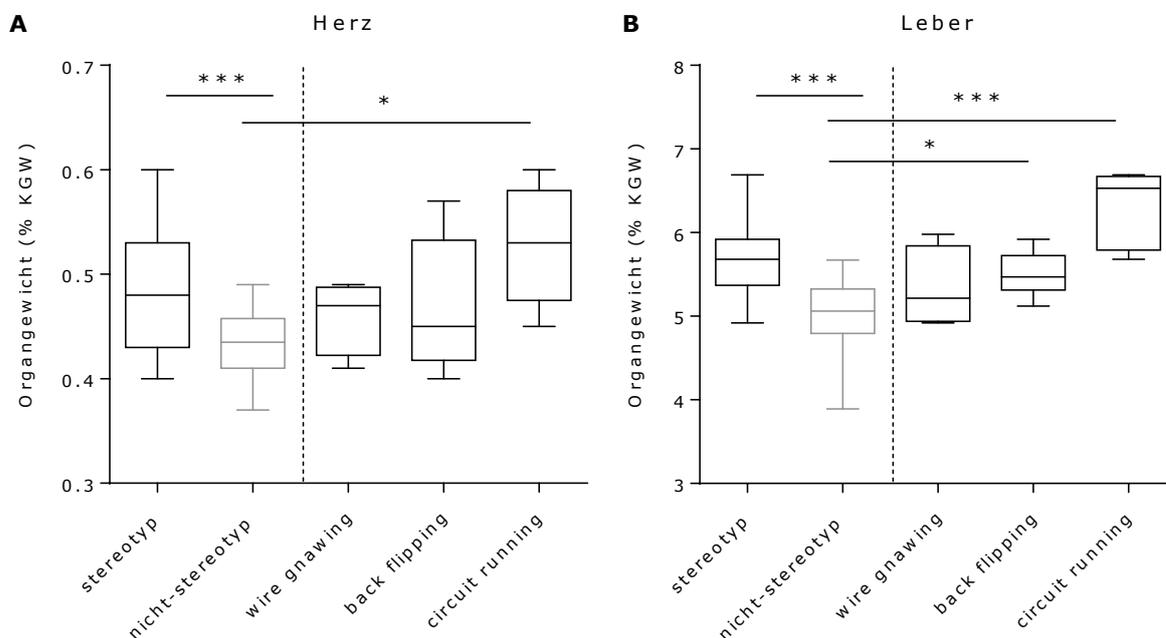


Abb. 5-21: Herz- und Lebergewicht. Gewichte von (A) Herz und (B) Leber relativ zum Körpergewicht (in %). Angeordnet nach den gesamten stereotypen ($n=19$) und nicht-stereotypen Tieren ($n=16$) und für die verschiedenen Formen stereotypen Verhaltens (*back flipping*; $n=10$, *circuit running*; $n=5$, *wire gnawing*; $n=4$) einzeln dargestellt als Boxplot. Box kennzeichnet Interquartilsabstand (unteres Quartil bei 25%, Median bei 50% und oberes Quartil bei 75%). Striche stellen 2,5% bzw. 97,5% Perzentil dar, Kruskal-Wallis-Test (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,005$).

Signifikante Unterschiede bei den Herzgewichten ergaben sich vor allem für die *circuit running* Mäuse, ihre Herzen waren signifikant schwerer im Vergleich zu den Herzen nicht-stereotyper FVB/NJ-Mäuse. Bei den Lebergewichten ergaben sich signifikante Unterschiede für Mäuse, die *circuit running* und *back flipping* ausgeübt haben. Die Lebergewichte dieser beiden Gruppen waren erhöht im Vergleich zu den Lebergewichten nicht-stereotyper Mäuse.

Das relative Milzgewicht wurde als Repräsentant des Immunsystems erfasst. Das Gehirngewicht wurde mit Fokus auf die Bestimmung der zerebralen Neurotransmitter SRT und DA bestimmt.

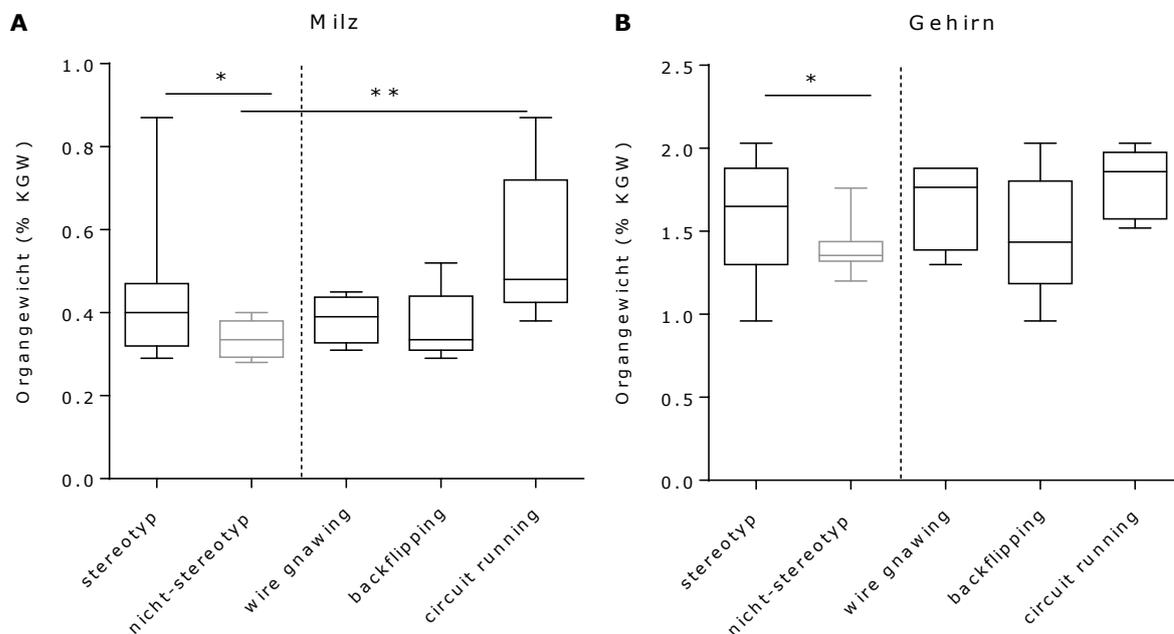


Abb. 5-22: Milz- und Gehirngewicht. Gewichte von **(A)** Milz und **(B)** Gehirn relativ zum Körpergewicht (in %). Angeordnet nach den gesamten stereotypen ($n=19$) und nicht-stereotypen Tieren ($n=16$) und für die verschiedenen Formen stereotypen Verhaltens (*back flipping*; $n=10$, *circuit running*; $n=5$, *wire gnawing*; $n=4$) einzeln dargestellt als Boxplot. Box kennzeichnet Interquartilsabstand (unteres Quartil bei 25%, Median bei 50% und oberes Quartil bei 75%). Striche stellen 2,5% bzw. 97,5% Perzentil dar, Kruskal-Wallis-Test (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,005$).

Signifikante Unterschiede bei den Milzgewichten ergaben sich vor allem für die *circuit running* Mäuse, ihre Milzen waren signifikant schwerer im Vergleich zu den Milzen nicht-stereotyper FVB/NJ-Mäuse. Die Gehirngewichte stereotyper FVB/NJ-Mäusen waren zwar signifikant erhöht gegenüber den Gewichten der Gehirne nicht-stereotyper FVB/NJ-Mäuse, allerdings ergaben sich keine Unterschiede in Abhängigkeit der Form des stereotypen Verhaltens.

Das Braunes Fettgewebe (BAT) hat einen bedeutenden Einfluss auf den Energieverbrauch und die Kälte-induzierte Thermogenese (Nedergaard et al., 2007). Daten aus an Ratten haben gezeigt, dass vermehrtes physisches Training die Aktivität des braunen Fettgewebes steigert, während sich in Ausdauer-trainierten humanen Athleten vergleichsweise niedrigere BAT-Aktivität nachweisen lies (Trexler et al., 2017).

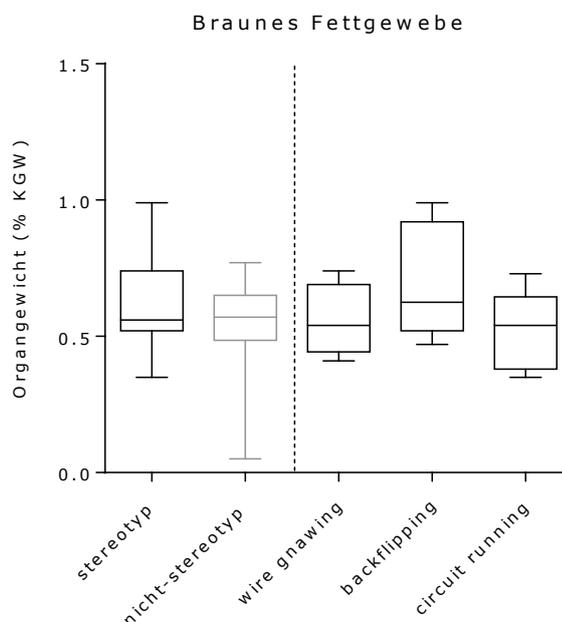


Abb. 5-22: Gewicht braunes Fettgewebe. Gewicht des braunen Fettgewebes relativ zum Körpergewicht (in %). Angeordnet nach den gesamten stereotypen (n=19) und nicht-stereotypen Tieren (n=16) und für die verschiedenen Formen (*back flipping*; n=10, *circuit running*; n=5, *wire gnawing*; n=4) stereotypen Verhaltens einzeln dargestellt als Boxplot. Box kennzeichnet Interquartilsabstand (unteres Quartil bei 25%, Median bei 50% und oberes Quartil bei 75%). Striche stellen 2,5% bzw. 97,5% Perzentil dar. Der Kruskal-Wallis-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Das Gewicht des braunen Fettgewebes unterschied sich weder zwischen nicht-stereotypen und stereotypen FVB/NJ-Mäusen, noch gab es signifikante Unterschiede in Anhängigkeit von der Form des stereotypen Verhaltens.

5.10 Fäkale Corticosteroide

Stereotypien werden vor dem Hintergrund der „Coping-Hypothese“ (Würbel, 2006) als eine Möglichkeit zur Anpassung an aversiven Umweltbedingungen diskutiert (Kapitel 2.10). Durch die Herabsenkung der Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Achse sollen weniger Cortisol (CSL) und Corticosteron (CST) ausgeschüttet werden und so die Stress-Levels gesenkt werden. In diverse Studien, bei denen die Tiere am Ausüben des stereotypen Verhaltens gehindert wurden, wurden gesteigerte Glucocorticoidspiegel

gemessen und so im Umkehrschluss die Coping-Hypothese bestätigt (Fureix et al., 2013; Ödberg, 2006; Würbel and Stauffacher, 1996), jedoch bleibt die Datenlage weiterhin inkongruent. Für die Messungen der fäkalen Corticosteroide (CSL, CST) wurden bei der vorliegenden Arbeit die stereotypen FVB/NJ-Mäuse mit den höchsten Stereotypie-Levels ausgewählt. Die fäkalen Corticosteron- und Cortisolgehalte wurden aus wöchentlichen randomisierten Kotproben mittels ELISA Kit bestimmt (Kapitel 4.3.9 und 4.4.1).

Tabelle 5-6: Fäkales Corticosteron. Corticosterongehalte des fäkalen Extrakts in pg/ml der nicht-stereotypen (nST) und stereotypen (ST) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) und unter Angabe der Anzahl (n=...) der jeweils analysierten Proben pro Gruppe und Versuchswoche (W1, [...], W11), T-Test für unabhängige Stichproben (* $p \leq 0,05$).

Corticosteron	nST		ST	
	Mittelwert \pm SD	n	Mittelwert \pm SD	n
W1	3998,00 \pm 345,81	n=4	4608,16 \pm 473,09	n=8
W2	3868,05 \pm 458,57	n=4	3894,52 \pm 395,42	n=7
W3	7155,90 \pm 1297,01	n=4	3849,40 \pm 527,04 *	n=8
W4	5919,80 \pm 915,39	n=4	4335,92 \pm 481,24	n=7
W5	5340,60 \pm 1422,86	n=4	5154,03 \pm 442,64	n=8
W6	5674,31 \pm 1693,42	n=4	4763,84 \pm 547,38	n=8
W7	7508,03 \pm 2208,21	n=4	574,15 \pm 760,15	n=8
W8	10604,92 \pm 1994,00	n=4	7033,17 \pm 892,47	n=8
W9	9105,48 \pm 1566,77	n=4	7939,33 \pm 1783,97	n=3
W10	9730,71 \pm 2215,64	n=4	7926,88 \pm 1539,43	n=3
W11	10372,26 \pm 1209,30	n=4	9034,97 \pm 1066,24	n=3

Tabelle 5-7: Fäkales Cortisol. Cortisolgehalte des fäkalen Extrakts in pg/ml der nicht-stereotypen (nST) und stereotypen (ST) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) und unter Angabe der Anzahl (n=...) der jeweils analysierten Proben pro Gruppe und Versuchswoche (W1, [...], W11). Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Cortisol	nST		ST	
	Mittelwert \pm SD	n	Mittelwert \pm SD	n
W1	1263,55 \pm 191,87	n=4	1034,01 \pm 199,55	n=5
W2	1874,82 \pm 365,20	n=4	1133,74 \pm 125,30	n=6
W3	2032,01 \pm 633,44	n=4	1938,36 \pm 585,03	n=5
W4	1530,98 \pm 162,54	n=4	2000,05 \pm 601,44	n=5
W5	1354,49 \pm 105,63	n=4	1217,84 \pm 255,10	n=6
W6	1330,76 \pm 191,57	n=4	1292,29 \pm 183,46	n=5
W7	1280,77 \pm 301,96	n=4	1441,21 \pm 212,87	n=6
W8	1781,93 \pm 869,78	n=3	1311,62 \pm 177,07	n=5
W9	805,66 \pm 167,63	n=3	2031,09 \pm 589,97	n=3
W10	1073,72 \pm 220,58	n=3	1926,76 \pm 182,94	n=3
W11	1197,08 \pm 236,05	n=3	1804,02 \pm 351,51	n=3

Wie in den Tabellen 5-6 und 5-7 aufgelistet, wiesen stereotype Tiere lediglich in der Versuchswoche 3 (Lebenswoche 6) signifikant niedrigere fäkale Corticosteronwerte auf. Zu den anderen Zeitpunkten und bei den fäkalen Cortisolgehalten gab es keine Gruppenunterschiede.

5.11 Neurotransmitter des Gehirns

Aus vorangegangenen pharmakologischen Studien ergab sich ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Ausüben stereotypen Verhaltens und den zerebralen Neurotransmittern Serotonin (SRT) und Dopamin (DA) [siehe Ausführungen in (Mostard, 2011) und die ausführliche Diskussion in Kapitel 6.4 der vorliegenden Arbeit. Deshalb wurde am Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam, Abteilung für Ernährungstoxikologie die bereits etablierte Methode zur SRT- und DA-Bestimmung im Fadenwurm *C.elegans* (Schumacher et al., 2015) an die Messungen aus Gesamtgehirn-Lysaten angepasst und im Rahmen weiterführender Untersuchungen die gehirnarealspezifische Bestimmung der Neurotransmitter etabliert (siehe Anhang H.3). SRT und DA wurden aus Gesamtgehirn-Lysaten mittels LC-MS/MS bestimmt (Kapitel 4.4.2).

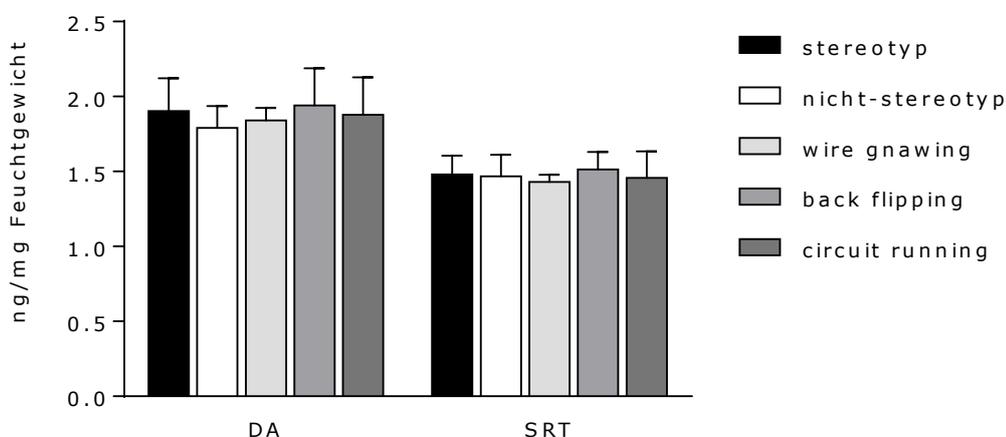


Abb. 5-23: Zerebrale Neurotransmittergehalte. Gehalt an Dopamin (DA) und Serotonin (SRT) in ng/mg Gehirngewicht in Gesamtgehirn-Lysaten, dargestellt als Mittelwert \pm SD für die nicht-stereotypen ($n=16$) und stereotypen ($n=19$) Tiere und die verschiedenen Formen der Stereotypien (*back flipping*; $n=10$, *circuit running*; $n=5$, *wire gnawing*; $n=4$). Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede.

Es stellten sich keine Unterschiede in den DA- und SRT-Gehalten heraus. Die Gehirne nicht-stereotyper Tiere enthielten $1,79 \pm 0,15$ ng/mg DA und $1,47 \pm 0,14$ ng/mg SRT, die der *wire gnawing* Tiere $1,84 \pm 0,08$ ng/mg DA und $1,43 \pm 0,05$ ng/mg SRT, die der *back flipping* Tiere $1,94 \pm 0,25$ ng/mg DA und $1,51 \pm 0,12$ ng/mg SRT und die Gehirne der *circuit running* Tiere enthielten $1,88 \pm 0,25$ ng/mg DA und $1,46 \pm 0,18$ ng/mg SRT. Die Gehirne der stereotypen Tiere insgesamt enthielten $1,90 \pm 0,22$ ng/mg DA und $1,48 \pm 0,12$ ng/mg SRT.

5.12 Glykogengehalte der Leber und des Muskels

Um mögliche Trainingseffekte zu charakterisieren, die durch das Ausüben stereotypen Verhaltens bedingt sein könnten, wurden die Glykogengehalte der Leber und des Muskels und die muskulären Triglyceridgehalte bestimmt. Während, die in der Leber vorhandenen Glykogenspeicher hauptsächlich zur Glucosehomöostase beitragen, deckt das muskulär vorhandene Glykogen vorrangig den Muskeleigenbedarf an Energie während physischer Aktivität (Jensen et al., 2011). Bekannterweise lassen sich bei Ausdauer-trainierten Menschen und auch nach anhaltendem Training von Ratten erhöhte Glykogengehalte der Skelettmuskulatur nachweisen (Burgomaster et al., 2008; Hespel and Richter, 1990; Hickner et al., 1997). Die UV-Test-basierte Glykogenbestimmung in der Leber und im *M. quadriceps* erfolgte nach der im Kapitel 4.4.3 beschriebenen Methode.

5.12.1 Glykogengehalt der Leber

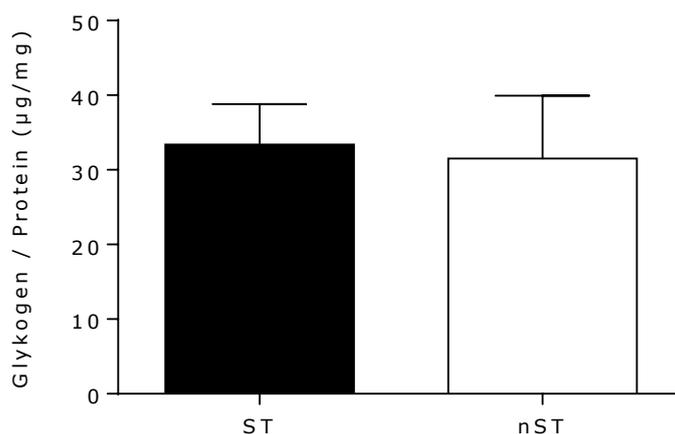


Abb. 5-24: Leberglykogen. Glykogengehalt der Leber in µg/ mg Protein, dargestellt als Mittelwert ±SEM der nicht-stereotypen (nST; n=16) und der stereotypen (ST; n=19) Tiere. Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Der Gruppenmittelwert des Glykogengehalts der Leber der nicht-stereotypen Tiere lag bei $31,50 \pm 8,45$ µg/ mg Protein, vergleichbar mit dem der stereotypen Tiere, welcher bei $33,38 \pm 5,42$ µg/ mg Protein lag.

Wobei sich auch keine Unterschiede im hepatischen Glykogengehalt in Abhängigkeit der Form des stereotypen Verhaltens ergaben (*wire gnawing*: $18,99 \pm 7,85$ µg/ mg; *back flipping*: $42,26 \pm 8,18$ µg/ mg; *circuit running*: $27,14 \pm 8,60$ µg/ mg Protein).

5.12.2 Glykogengehalt des Muskels

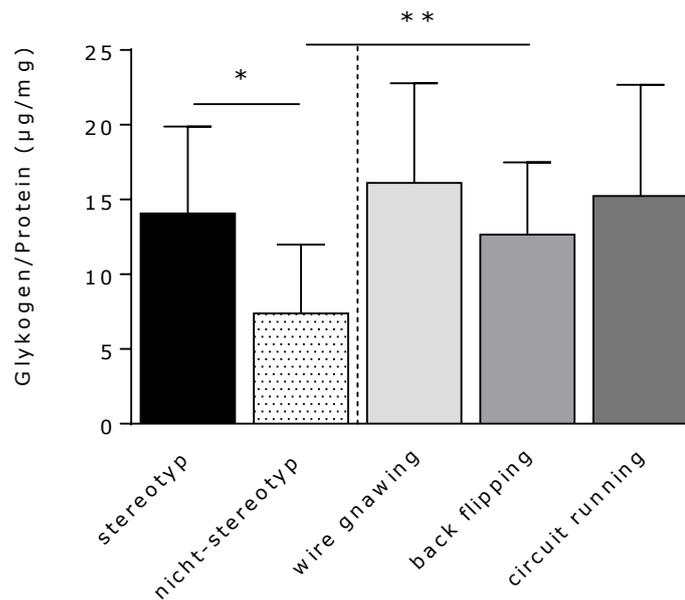


Abb. 5-25: Muskelglykogen. Glykogengehalt des *M. quadriceps* in µg/ mg Protein, dargestellt als Mittelwert ±SEM der nicht-stereotypen (nST; n=16) und der stereotypen (ST; n=19) Tiere und die verschiedenen Formen der Stereotypen (*back flipping*; n=10, *circuit running*; n=5, *wire gnawing*; n=4), (T-Test unabhängiger Stichproben; *p≤0,05; ** p≤0,01).

Im Mittel lag der Glykogengehalt des *M. quadriceps* der nicht-stereotypen Tiere bei $7,39 \pm 1,15$ µg/ mg Protein. Der Mittelwert des Glykogengehalts des Muskels der Stereotypie-Gruppe lag bei $14,06 \pm 1,33$ µg/ mg Protein und war damit signifikant erhöht.

FVB/NJ-Mäuse, die das *back flipping* ausübten, wiesen im Vergleich zu nicht-stereotypen Mäusen erhöhte muskuläre Glykogengehalte auf ($14,04 \pm 0,77$ µg/ mg Protein; $p < 0,01$). Es ergaben sich allerdings keine Unterschiede für *circuit running* ($15,24 \pm 3,33$ µg/ mg Protein) und *wire gnawing* ($16,11 \pm 3,34$ µg/ mg Protein) Tiere.

5.13 Triglyceridgehalt des Muskels

Die intramuskulär gespeicherten Lipidtröpfchen dienen als wichtige Substratquelle während eines Ausdauertrainings mit moderater Intensität (Hoppeler et al., 1985; Sacchetti et al., 2002; van Loon et al., 2003). Die enzymatische Triglyceridbestimmung im *M. quadriceps* erfolgte nach der in Kapitel 4.4.4 beschriebenen Methode.

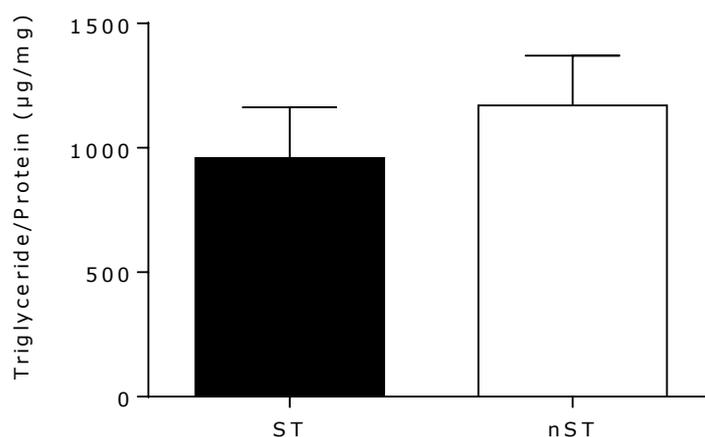


Abb. 5-26: Muskeltriglyceride. Triglyceridgehalt des *M. quadriceps* in µg/ mg Protein, dargestellt als Mittelwert ±SEM der nicht-stereotypen (nST; n=16) und der stereotypen (ST; n=19) Tiere. Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Es stellte sich kein Unterschied in den Triglyceridgehalten des *M. quadriceps* zwischen den nicht-stereotypen Tieren mit 1170,60±200,50 µg/ mg Protein und den stereotypen Tieren mit 958,82±203,79 µg/ mg Protein heraus.

Die muskulären Triglyceridgehalte unterschieden sich lediglich zwischen *wire gnawing* (1750,36±577,55 µg/ mg Protein) und *back flipping* (846,35±268,72 µg/ mg Protein; $p < 0,05$) Tieren. Die Mäuse, die das *circuit running* ausübten, lagen bei 550,51±108,61 µg/ mg Protein.

5.14 Histologische Parameter des Herzens

5.14.1 Kardiomyozytenflächen

Das bei der finalen Organentnahme festgestellte erhöhte relative Herzgewicht sollte nun in weiteren histologischen Analysen hinsichtlich Parameter einer Hypertrophie und/oder kardialen Fibrose untersucht werden. Die Bestimmung der Flächen der Kardiomyozyten erfolgte mikroskopisch mit Hilfe der Axio Vision Software an PAS-gefärbten Herzschnitten (Kapitel 4.5.2 und 4.5.3). Vermessen wurden bei einer 40-fachen Vergrößerung durchschnittlich 100 Kardiomyozyten pro Tier.

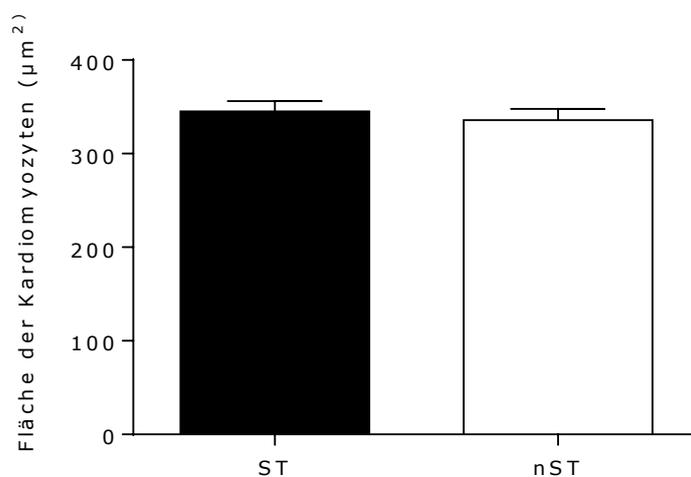


Abb. 5-27: Kardiomyozytenflächen. Fläche der Kardiomyozyten der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Hinsichtlich der durchschnittlichen Größe der Kardiomyozyten, gemessen am Flächeninhalt des einzelnen Kardiomyozyten, ergaben sich keine Gruppenunterschiede. So lag der Mittelwert der nicht-stereotypen Tiere bei $335,84 \pm 11,87 \mu\text{m}^2$ und der der stereotypen Tiere bei $345,23 \pm 47,73 \mu\text{m}^2$. Auch zwischen den Tieren der verschiedenen Typen stereotypen Verhaltens ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der durchschnittlichen Kardiomyozytenflächen (*wire gnawing*: $346,98 \pm 20,14 \mu\text{m}^2$; *circuit running*: $335,55 \pm 15,68 \mu\text{m}^2$; *back flipping* $349,37 \pm 18,43 \mu\text{m}^2$).

5.14.2 Kardiomyozytendiameter

Die Bestimmung der Kardiomyozytendurchmesser erfolgte mikroskopisch mit Hilfe der Axio Vision Software an PAS-gefärbten Herzschnitten (Kapitel 4.5.2 und 4.5.4). Der Durchmesser von durchschnittlich 100 Kardiomyozyten pro Tier wurde bei einer 20-fachen Vergrößerung vermessen.

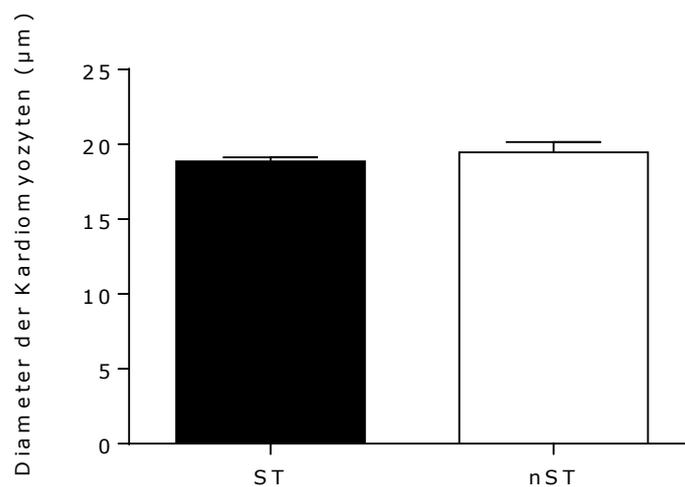


Abb. 5-28: Kardiomyozytendiameter. Durchmesser der Kardiomyozyten der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Es ergaben sich keine Unterschiede im Durchmesser der Kardiomyozyten zwischen nicht-stereotypen und stereotypen Mäusen. Ermittelt wurde hier der Diameter durch den Zellkern in Längs- bzw. Querachse der Zelle und die jeweils diagonal verlaufenden Diameter und daraus der Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert betrug $19,47 \pm 0,67 \mu\text{m}$ für stereotype FVB/NJ-Mäuse und $18,87 \pm 0,27 \mu\text{m}$ für die nicht-stereotypen Mäuse. Die FVB/NJ-Mäuse, die *wire gnawing* ausübten, hatten hierbei einen durchschnittlichen Kardiomyozytendiameter von $19,02 \pm 0,63 \mu\text{m}$, die *circuit running* Tiere $18,94 \pm 0,27 \mu\text{m}$ und die *back flipping* Mäuse $18,77 \pm 0,45 \mu\text{m}$.

5.14.3 Kollagenanteil des Herzen

Als Marker einer möglichen kardialen Fibrose wurde der Anteil des Gesamtkollagens des Herzens bestimmt. Dazu wurde die Sirius Red positiv gefärbte Fläche von 10 ausgewählten Bereichen eines histologischen Schnittes pro Tier mit Hilfe der ImageJ Software erfasst (Kapitel 4.5.2 und 4.5.5).

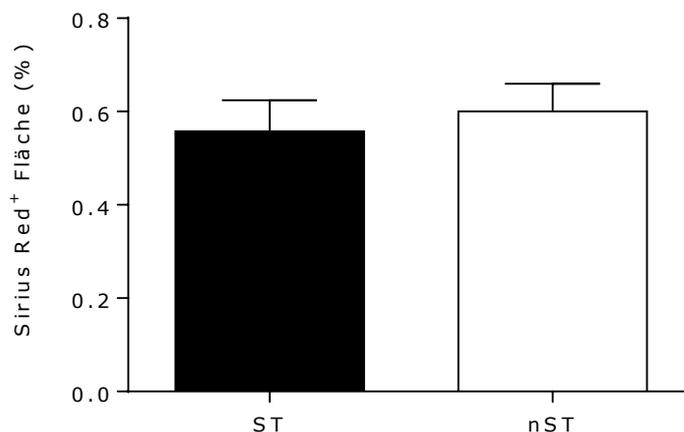


Abb. 5-29: Herzkollagengehalt. Kollagenanteil des Herzens, gemessen an der Sirius-Red positiven Fläche, der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Der Kollagenanteil des Herzens variierte nicht zwischen den Gruppen. Für die nicht-stereotypen Mäuse ergab sich ein Mittelwert von $0,60 \pm 0,06$ %, vergleichbar zum Mittelwert der stereotypen Tiere, welcher bei $0,56 \pm 0,07$ % lag. Die Herzen der back flipping Tiere wiesen einen Kollagenanteil von $0,65 \pm 0,11$ % auf und damit nicht signifikant mehr als die *wire gnawing* Mäuse mit $0,45 \pm 0,09$ % und die *circuit running* Tiere mit $0,45 \pm 0,08$ %.

5.15 Histologische Parameter der Skelettmuskulatur

5.15.1 Muskelquerschnitt des *M. soleus*

Der *M. soleus* wurde für die histologischen Analysen als Prototyp der roten Slow-Twitch Muskelfasern (MyHC Typ I) ausgewählt. Als Marker für eine mögliche trainingsbedingte muskuläre Hypertrophie stereotyper FVB/NJ-Mäuse, wurde die Gesamtquerschnittsfläche des *M. soleus* mikroskopisch mit Hilfe der Axio Vision Software an zwei SR-gefärbten Muskelquerschnitten pro Tier bestimmt (Kapitel 4.5.2 und 4.5.6).

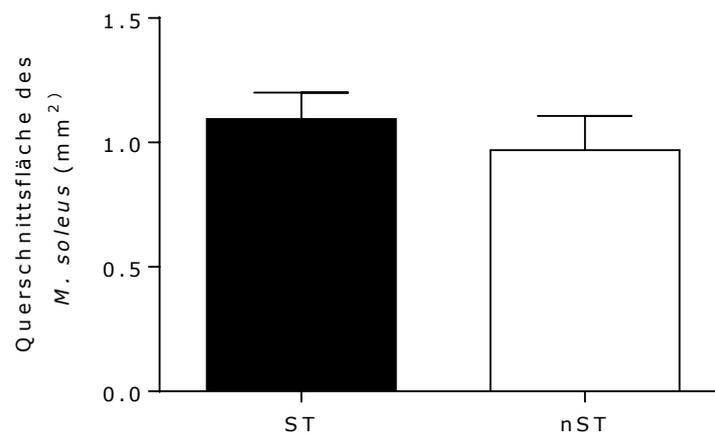


Abb. 5-30: Querschnitt des *M. soleus*. Muskelquerschnittsfläche des *M. soleus* in mm² der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert ±SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Es ergaben sich keine Unterschiede in der Gesamtquerschnittsfläche des *M. soleus* zwischen nicht-stereotypen FVB/NJ-Mäusen mit $0,97 \pm 0,13$ mm² und stereotypen Mäusen mit $1,09 \pm 0,16$ mm². Stereotype *wire gnawing* Mäuse wiesen die größte durchschnittliche Gesamtquerschnittsfläche des *M. soleus* auf mit $1,19 \pm 0,19$ mm², nicht signifikant mehr als *back flipping* Tiere mit $1,16 \pm 0,18$ mm² und *circuit running* FVB/NJ-Mäuse mit $0,89 \pm 0,07$ mm².

5.15.2 Anzahl der Myozyten des *M. soleus*

Die Anzahl der Myozyten wurde mikroskopisch im Querschnitt des *M. soleus* bestimmt (Kapitel 4.5.2 und 4.5.7).

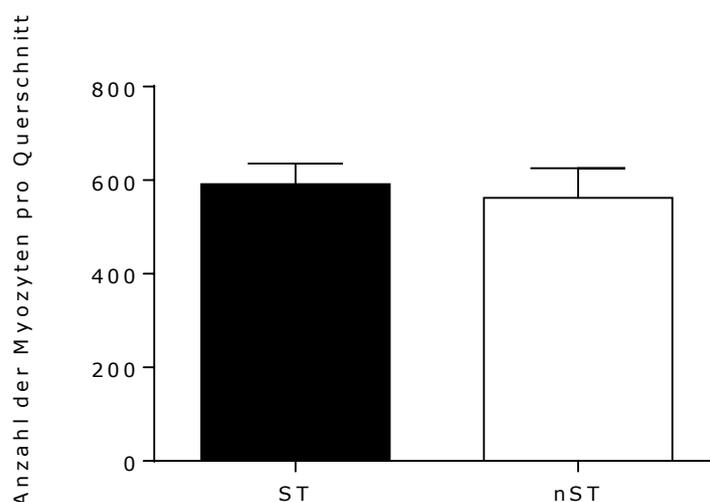


Abb. 5-31: Anzahl der Myozyten des *M. soleus*. Anzahl der Myozyten/ Querschnitt des *M. soleus* der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Es stellte sich kein Gruppenunterschied hinsichtlich der Anzahl der Myozyten pro Muskelquerschnitt des *M. soleus* heraus. Bei nicht-stereotypen Tieren waren durchschnittlich $562,13 \pm 61,56$ Myozyten/Muskelquerschnitt zu zählen, während sich bei stereotypen Mäusen durchschnittlich $591,42 \pm 44,22$ Myozyten/Muskelquerschnitt ergaben. Die Anzahl der Myozyten pro Muskelquerschnitt des *M. soleus* unterschieden sich ebenfalls nicht zwischen den Tieren der verschiedenen Typen stereotypen Verhaltens (*wire gnawing*: $707,50 \pm 108,06$; *circuit running* $586,70 \pm 58,81$; *back flipping* $547,35 \pm 65,50$ Myozyten/Muskelquerschnitt).

5.15.3 Durchmesser der Myozyten des *M. soleus*

Mikroskopisch ermittelt wurden der Durchmesser durch den Zellkern in Längs- bzw. Querachse der Zelle und die jeweils diagonal verlaufenden Durchmesser und daraus der Mittelwert gebildet (Kapitel 4.5.2 und 4.5.8). Vermessen wurden bei 10-facher Vergrößerung 20-60 Myozyten pro Tier und der jeweilige Durchschnitt pro Tier ermittelt. Die Mittelwerte pro Tier sind hier wiederum als Gruppenmittelwerte dargestellt.

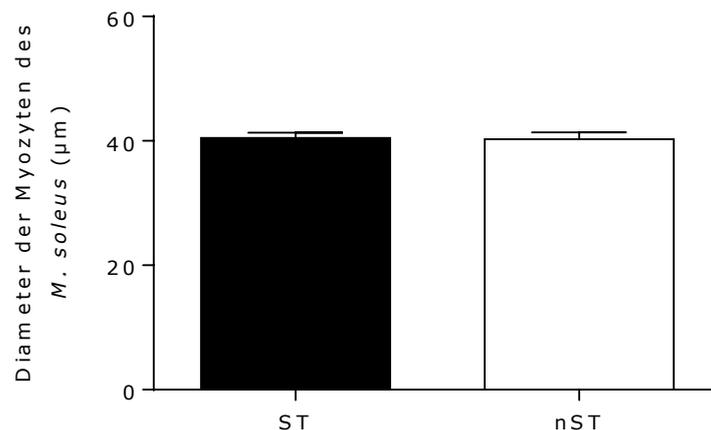


Abb. 5-32: Myozytendiameter des *M. soleus*. Durchmesser der Myozyten des *M. soleus* der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST, n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Hinsichtlich der durchschnittlichen Durchmesser der Myozyten des *M. soleus* ergaben sich keine Gruppenunterschiede. Ermittelt wurde hier der Durchmesser durch den Zellkern in Längs- bzw. Querachse der Zelle und die jeweils diagonal verlaufenden Durchmesser und daraus der Mittelwert gebildet. Die Durchmesser der Myozyten nicht-stereotyper FVB/NJ-Mäuse beliefen sich auf $40,23 \pm 1,09 \mu\text{m}$, die der stereotypen Mäuse auf $40,38 \pm 0,87 \mu\text{m}$. Für stereotype Mäuse, die das *Wire Gnawing* ausübten, ergaben sich Durchmesser der Myozyten des *M. soleus* von $40,75 \pm 2,21 \mu\text{m}$, welche sich vergleichbar zu den Durchmessern der Myozyten der *circuit running* ($39,72 \pm 0,56 \mu\text{m}$) und *back flipping* Tiere ($40,56 \pm 1,45 \mu\text{m}$) verhielten.

5.15.4 Kollagenanteil des *M. soleus*

Mit Hilfe eines Software-generierten Flächenmessprogramm von Axio Vision wurde der Anteil Sirius Red positiv gefärbter Fläche (und somit an Kollagen) bestimmt (Kapitel 4.5.2 und 4.5.10). Dazu wurden pro Tier bei zwei auf annähernd gleicher Ebene liegenden Schnitten die Flächen an Sirius Red positiv gefärbten Bereichen erfasst.

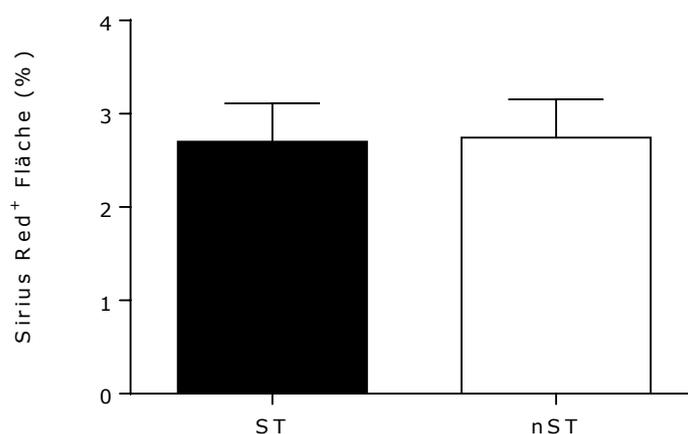


Abb. 5-33: Kollagenanteil *M. soleus*. Kollagenanteil des *M. soleus*, gemessen an der Sirius-Red positiven Fläche, der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Bezogen auf die Gesamtquerschnittsfläche des *M. soleus* ergaben sich keine Unterschiede im relativen Anteil an Kollagen. Für die nicht-stereotypen Mäuse ergab sich ein Mittelwert von $2,75 \pm 0,40$ %, vergleichbar zum Mittelwert der stereotypen Tiere, welcher bei $2,71 \pm 0,41$ % lag. Auch zwischen den Typen stereotypen Verhaltens ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Kollagengehalten des *M. soleus* (*wire gnawing*: $2,19 \pm 0,63$ %; *circuit running*: $2,98 \pm 0,93$ %, *back flipping*: $2,28 \pm 0,52$ %).

5.15.5 Durchmesser der Myozyten des *M. quadriceps*

Der *M. quadriceps* wurde ausgewählt, da er sich im Gegensatz zum *M. soleus* hauptsächlich aus den weißen Fast-Twitch Muskelfasern (MyHC Typ I Ib, bzw. I IX) zusammensetzt. Zur Bestimmung der Durchmesser der Myozyten (als Indikator einer muskulären Hypertrophie) wurden pro Tier 50 Zellen nach festgelegten Kriterien ausgewählt und bei 10-facher Vergrößerung vermessen (Kapitel 4.5.2 und 4.5.9). Ermittelt wurde hier der Durchmesser durch den Zellkern in Längs- bzw. Querachse der Zelle und die jeweils diagonal verlaufenden Durchmesser und daraus der Mittelwert gebildet.

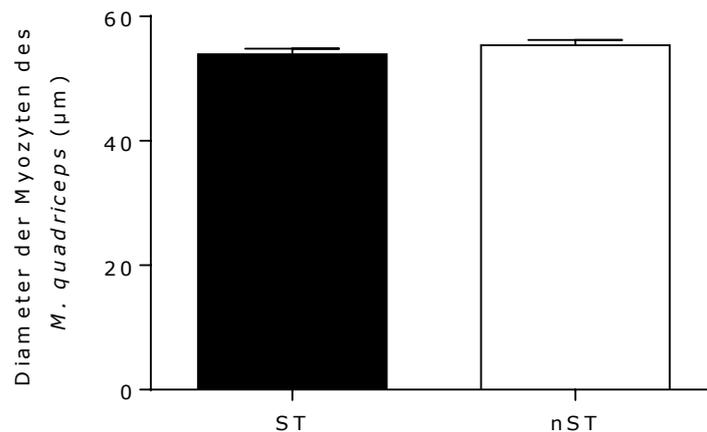


Abb. 5-34: Myozytendiameter des *M. quadriceps*. Durchmesser der Myozyten des *M. quadriceps* der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Entsprechend den Daten zum *M. soleus* verhielten sich die Ergebnisse der histologischen Analysen des *M. quadriceps*. Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Durchmesser des *M. quadriceps*. Weder zwischen nicht-stereotypen (nST) und stereotypen Tieren (ST), noch zwischen Tieren, die die verschiedenen Typen stereotypen Verhaltens ausgeübt haben (nST: $55,38 \pm 0,80$; ST: $53,95 \pm 0,86$; *wire gnawing*: $54,42 \pm 2,38$; *circuit running*: $53,87 \pm 0,94$; *back flipping* $53,79 \pm 1,35$ μm).

5.15.6 Kollagenanteil des *M. quadriceps*

Um Anzeichen einer möglichen muskulären Fibrose zu detektieren, wurde bei 10 Bildern pro Tier eines SR-gefärbten Muskelquerschnitts in der 20-fachen Vergrößerung der prozentuale Anteil an Sirius-Red positiv gefärbter Fläche (respektive Kollagen) bestimmt (Kapitel 4.5.2 und 4.5.11).

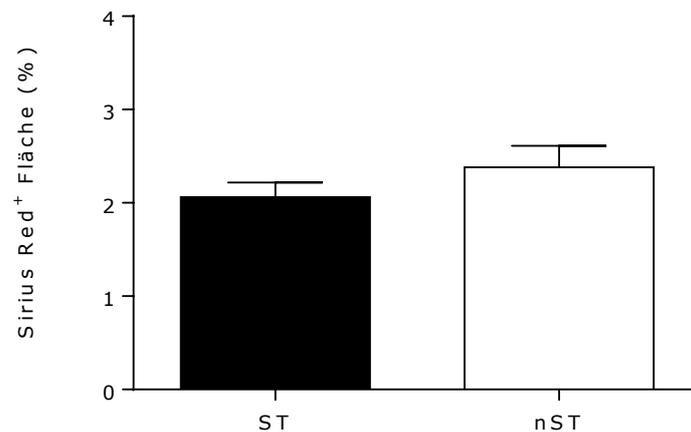


Abb. 5-35: Kollagenanteil *M. quadriceps*. Kollagenanteil des *M. quadriceps*, gemessen an der Sirius-Red positiven Fläche, der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Auch hinsichtlich des Kollagenanteils unterschieden sich die *Mm. quadriceps* nicht (nST: $2,37 \pm 0,22$; ST: $2,06 \pm 0,15$; *wire gnawing*: $2,17 \pm 0,24$; *circuit running*: $2,32 \pm 0,48$; *back flipping* $1,89 \pm 0,16$ %).

5.16 PCNA-positive Zellen der Milz

Um das erhöhte relative Milzgewicht stereotyper FVB/NJ-Mäuse genauer zu charakterisieren, wurde der Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) – Gehalt bestimmt. Als Marker einer möglichen gesteigerten Replikations-, bzw. Proliferationsrate innerhalb der Milz, wurden pro Tier bei einer 40-fachen Vergrößerung die in der Immunhistologie PCNA-positiv angefärbten Zellen in 10 Rasterflächen gezählt (Kapitel 4.5.2 und 4.5.12).

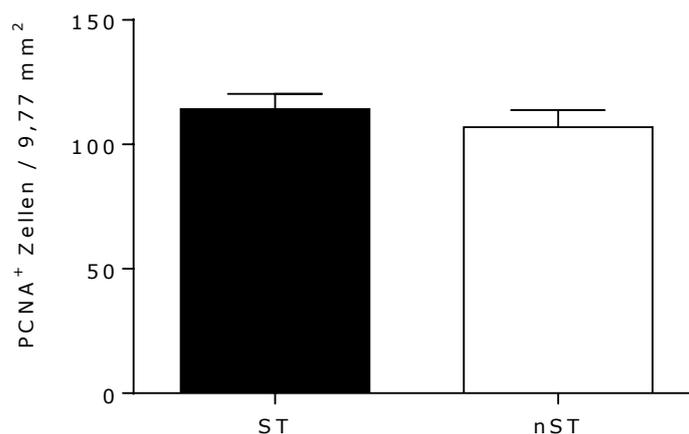


Abb. 5-36: PCNA-positive Zellen der Milz. Anzahl PCNA-positiver Zellen der Milz nicht-stereotyper (nST; n=16) und stereotyper (ST; n=19) Tiere, dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Hinsichtlich der Anzahl PCNA-positiver Zellen der Milz ergaben sich keine Unterschiede zwischen nicht-stereotypen Tieren mit durchschnittlich $106,93 \pm 6,70$ PCNA⁺-Zellen/ $9,765625 \text{ mm}^2$ (Rasterfläche) und stereotypen FVB/NJ-Mäusen mit einem Mittelwert von $114,13 \pm 6,24$ PCNA⁺-Zellen/ $9,765625 \text{ mm}^2$ (Rasterfläche). *Circuit running* Mäuse wiesen die höchste Anzahl PCNA-positiver Zellen auf mit $126,68 \pm 17,13$ und damit nicht signifikant mehr als *back flipping* FVB/NJ-Mäuse mit $109,93 \pm 6,22$ und *wire gnawing* Tiere mit $107,20 \pm 15,52$ PCNA⁺-Zellen/ $9,765625 \text{ mm}^2$ (Rasterfläche).

6 Diskussion

Motorische Stereotypen, wie sie bei der FVB/NJ-Maus vorkommen, sind gekennzeichnet durch repetitive und invariante Verhaltensaufführungen, die funktionslos, bzw. nicht zielführend für das Tier zu sein scheinen. Sie werden als umweltbedingt definiert und kommen nahezu ausschließlich unter artifiziellen Haltungsbedingungen mit restriktiven Möglichkeiten zur artgerechten Umweltbewältigung vor (Mostard, 2011). Laut MASON und anderen Wissenschaftlern stellen sie Abweichungen vom Normalverhalten dar (Mason, 1991) und werden als Indikator potentiell beeinträchtigten Wohlbefindens diskutiert (Hewson, 2003). In dieser Arbeit soll das stereotype Verhalten der FVB/NJ-Maus, exemplarisch für stereotype Mauslinien, erstmals detailliert charakterisiert und herausgearbeitet werden, welche Konsequenzen das Ausüben von Stereotypen für den Metabolismus des Tieres hat. Das somit gewonnene Verständnis über die Hintergründe und die Auswirkungen des stereotypen Verhaltens soll zusammengefasst einen Beitrag zum Refinement leisten, um im Sinne dieses „R“s, des von Russell und Burch entwickelten Konzepts (Russell and Burch, 1959), die Haltungs-, Lebens- und Versuchsbedingungen von für tierexperimentelle Zwecke gehaltenen Mäusen zu verbessern. Auf verschiedenen Ebenen (Zucht, Parentalgeneration, Nachkommen der F₁-Generation) wurden Mäuse des Inzuchtstammes FVB/NJ, die spontan Stereotypen entwickelten und Mäuse dieses Stammes, die sich scheinbar normal verhielten, beobachtet und metabolisch phänotypisiert und die so erlangten Erkenntnisse systematisch zusammengetragen.

6.1 Einfluss des maternalen Verhaltens auf die Entwicklung von Stereotypen

Die durchschnittliche Wurfgröße stereotyper FVB/NJ-Muttertiere entsprach annähernd der nicht-stereotyper FVB/NJ-Muttertiere, jedoch führten die bis zu 100%igen Aufzuchtverluste stereotyper Muttertiere zu einer reduzierten Anzahl abgesetzter Jungtiere. Durch das Ausüben stereotypen Verhaltens erfolgte die Begattung zudem meist erst nach mehreren Versuchen. Daraus ergaben sich längere Intervalle bis stereotype Weibchen tragend wurden. Der nachgewiesene gesteigerte Reproduktionserfolg stereotyper Muttertiere von in Gefangenschaft züchtenden Afrikanischen Striemen-Grasmäusen konnte demnach bei FVB/NJ-Mäusen nicht bestätigt werden (Jones et al., 2010b). Ebenso wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Hinweise für eine direkte (von der Parental- auf die erste Tochtergeneration) genetische Transmission stereotypen Verhaltens gefunden, wie sie sich bei den bereits erwähnten Afrikanischen Striemen-Grasmäusen darstellten. Bei Tieren dieser Gattung belegten Studien, dass Jungtiere stereotyper Elterntiere zu einer erhöhten Prävalenz von Stereotypen neigen (Schwaibold et al., 2001) und dass dieser Einfluss eher maternalen, als paternalen Ursprungs zu sein scheint (Jones et al., 2008). Bei den FVB/NJ-Mäusen dieser Studie ergab sich kein Zusammenhang zwischen dem stereotypen Verhalten des Muttertiers und der Entwicklung

von Stereotypen bei den Nachkommen in der F₁-Generation. Jungtiere nicht-stereotyper Muttertiere zeigten ähnliche Prävalenzen stereotypen Verhaltens wie die Jungtiere stereotyper Muttertiere (Kapitel 5.2).

Die Muttertiere unterschieden sich u.a. nicht im Ruhe-, Fress-, Putz-, Nage- und Nestbauverhalten. Auch hinsichtlich des maternalen Verhaltens ergaben sich keine Unterschiede zwischen nicht-stereotypen und stereotypen Muttertieren. Ein Unterschied ist das scheinbar vermehrt vorhandene Interaktionsverhalten nicht-stereotyper Muttertiere mit ihren Jungtieren. Diesbezüglich muss allerdings erwähnt werden, dass hier nur jene Interaktionen aufgelistet sind, welche tatsächlich präzise beobachtet werden konnten. Im Sinne einer eingeschränkten Beobachtungsmöglichkeit auf Grund technischer Voraussetzungen (*Environmental Enrichment*) ergaben sich hierbei teilweise Einschränkungen. Demnach geben die Daten bezüglich der Aufenthalte der Muttertiere im Nest bzw. in Kontakt zu den Jungen mehr Aufschluss über die Intensität des maternalen Verhaltens. Diese Aspekte unterschieden sich nicht zwischen den stereotypen und nicht-stereotypen Muttertieren. Somit scheint eine frühe soziale Komponente nicht ursächlich für die spätere Entwicklung des stereotypen Verhaltens zu sein. Die Ontogenese der Stereotypen der Jungtiere geht bei den FVB/NJ-Mäusen dieser Arbeit zeitlich nicht mit dem Absatz einher. Die Entwicklung des stereotypen Verhaltens könnte mit der einsetzenden Geschlechtsreife zusammenhängen. Üblicher Weise erreichen die meisten Mausstämme, die für tierexperimentelle Zwecke eingesetzt werden, ihre Geschlechtsreife im Alter von fünf bis acht Wochen, wobei es starke stammabhängige Unterschiede gibt (Hedrich and Bullock, 2004). Dies stellte sich ebenfalls als kritischer Zeitraum für die Entwicklung stereotypen Verhaltens bei den Tieren dieser Arbeit dar.

6.2 Einfluss stereotypen Verhaltens auf das Explorations- und Raumnutzungsverhalten

Die Messung des Angst-bezogenen Verhaltens bei Mäusen erfolgt unter Verwendung etablierter Tests, wie dem erhöhten Plusförmigen-Labyrinth (*elevated Plus-maze*), der Hell-Dunkel-Box (*Light-Dark-Chamber*) oder dem Open Field Test. Diese Verfahren basieren auf der Exposition zu einer unbekanntem, potentiell aversiven Umgebung. Man unterscheidet eine zeit- und situationsabhängige Angst, die auf Erfahrungen zu einem bestimmten Zeitpunkt bezogen wird oder in Anwesenheit eines spezifischen Stimulus gezeigt wird (*state anxiety*) und eine Furcht, die als Charakterzug eines Tieres kontextspezifisch nicht variiert und als verankertes Merkmal eines Individuums verstanden wird (*trait anxiety*). Das angstbezogene Verhalten von FVB/N-Mäusen wurde in mehreren Studien u.a. mit dem Verhalten von C57BL/6-Mäusen verglichen. Die Verhaltenstests lieferten dabei konträre Daten. MINEUR et al. (Mineur and Crusio, 2002) stellten fest, dass

FVB/N-Mäuse im Vergleich zu Mäusen des Stammes C57BL/6 vermehrt ängstliches Verhalten im Plus-Maze zeigten und sich außerdem hyperaktiv verhielten. Die Hyperaktivität konnten KULESSKAYA et al. (Kuleshkaya and Voikar, 2014; Vöikar et al., 2001) ebenfalls feststellen, jedoch fanden sie keine Unterschiede im Verhalten zwischen den Stämmen im erhöhten Plus-Maze und in der Light-Dark-Box. In der Studie von GIRARD zeigten sich die FVB/N-Mäuse gegensätzlich vorangegangener Studien mit einer geringeren Aktivität im Open Field Test und stellten sich als weniger ängstlich heraus (Girard et al., 2016). Bei diesen Untersuchungen wurde nicht explizit erwähnt, ob es sich um stereotype oder nicht-stereotype FVB/N-Mäuse handelt. Studien zum Explorationsverhalten, dem Suchen nach Neuem (*novelty seeking*) und zum Wahlverhalten ergaben jedoch, dass nicht nur die Form, sondern auch das Level des stereotypen Verhaltens die Ergebnisse von Verhaltensstudien beeinflussen können (Novak et al., 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein modifizierter Open Field Test verwendet. Im Zentrum des Open Fields befand sich ein rotes Kunststoffhaus als Versteck- und Rückzugsmöglichkeit. Eine gesteigerte Angst vor der unbekannteren Umgebung äußerte sich in diesem Versuchsaufbau demnach in vermehrter Zeit, die im Zentrum (Kunststoff-Haus) oder im Randbereich des Open Fields (äußere Zone) verbracht wurde. Die stereotypen FVB/NJ-Mäuse hielten sich während des ersten 5-minütigen Open Field Tests vermehrt im Haus, also in der „sicheren“ Umgebung, und weniger Zeit in der äußeren Zone auf, sie zeigten demnach weniger exploratives Verhalten. Während des zweiten 5-minütigen Tests wurde dieser Effekt aufgehoben. Es gab hier keine Unterschiede im Verhalten zwischen den nicht-stereotypen und den stereotypen Mäusen. Nachdem die stereotypen Tiere sich bei der ersten Konfrontation vermehrt ängstlich zeigten, kann diese Tatsache als Zeichen einer vorsichtigen Adaptation an die neue Umgebung gewertet werden. Im 24-Stunden Test wurde das Kunststoff-Haus mit der darin befindlichen Nestbaumöglichkeit zum Schlafen bzw. Ausruhen genutzt. Während dieses Tests hielten sich die stereotypen Tiere tendenziell (wenn auch nicht signifikant) weniger im Haus und vermehrt in der äußeren Zone auf. Dabei zeigten stereotype FVB/NJ-Mäuse während des 24-Tests eine signifikant erhöhte Gesamtaktivität und legten signifikant größere Distanzen zurück. Hier gab es allerdings starke Unterschiede zwischen den verschiedenen Formen stereotypen Verhaltens, die im Rahmen dieser Studie bei den FVB/NJ-Mäusen festgestellt wurden. Mäuse, die das kreisförmige Ablaufen des Käfigbodens ausübten (*circuit running*), erreichten hierbei die höchsten Aktivitätslevels und legten die weitreichendsten Distanzen zurück. Mäuse, die im Haltungskäfig vehement das Käfiggitter benagten (*wire gnawing*), verhielten sich im 24-Stunden Open Field ähnlich den nicht-stereotypen Mäusen. Dabei nutzten sie kaum die externe Futterraufe, die für den 24-Stunden Test ins Open Field verbracht wurde, zum Klettern und Benagen.

Im Rahmen des dritten (24-Stunden) Open Field Tests konnte festgestellt werden, dass sich vor allem *circuit running* ausübende Mäuse stets in eine bevorzugte Richtung um die eigene Körperachse drehen, während nicht-stereotype Mäuse und Mäuse, die die anderen Stereotypieformen zeigen, sich nicht für eine der beiden Laufrichtungen entscheiden (Kapitel 5.5.3). Das Vorhandensein einer Händigkeit bei Mäusen ist bereits bekannt (Biddle and Eales, 1996), es bleibt jedoch unklar, ob die im Rahmen des stereotypen Verhaltens gezeigten Seitenpräferenzen der Links- bzw. Rechtshändigkeit des Menschen entsprechen könnten. Diese Tendenz, stets eine bevorzugte Richtung zu wählen, zeigt sich auch bei der Laufstereotypie von Pferden. In diesem Fall stellte sich heraus, dass es einen starken saisonalen Zusammenhang gibt und die Richtung weniger von einer Händigkeit abhängig ist (Bredenbröker, 2013).

Stereotype FVB/NJ-Mäuse zeigten sowohl in der Open Field Arena, als auch in den *Home-Cage*-ähnlichen Käfigen der Messeinrichtung der ITK eine signifikant höhere Bewegungsaktivität als nicht-stereotype Mäuse. Wobei vor allem die Mäuse, die das *circuit running* ausüben hervorzuheben sind (Kapitel 5.5.4 und 5.6.1). Es stellte sich heraus, dass scheinbar normal entwickelte Tiere (=nicht-stereotyp), selbst wenn sie ein vermehrtes Platzangebot zur Verfügung haben, dieses nicht durch mehr Bewegung ausschöpfen. Und dass ebenso stereotype Tiere, mit einem erhöhten Aktivitätsniveau, ihren Bewegungsanspruch scheinbar unter *Home Cage* Bedingungen decken können, denn der Unterschied im Laufpensum der *circuit running* Mäuse zwischen dem Open Field und der ITK ist statistisch nicht signifikant. Hervorzuheben ist allerdings, dass das Tier, das die größte Distanz im Rahmen dieses Projektes zurücklegte, insgesamt 26,12 km in 24 Stunden lief. Und das im *Home-Cage*-ähnlichen Käfig der ITK und nicht in der Open Field Arena. Hingegen bleibt unklar ob sich die Stereotypien in diesem Maße ausgebildet hätten, wenn die Mäuse bereits in den Größenverhältnissen des Open Fields aufgewachsen wären. Allerdings ist bekannt, dass nicht allein durch ein größeres Haltungsareal das Wohlbefinden der Tiere gesteigert wird, die Erhöhung der biologisch relevanten Käfigkomplexität kann von beträchtlicherem Wert für Mäuse sein (Gaskill and Pritchett-Corning, 2015). Die komplexe Strukturierung und Ausgestaltung der Haltungsumwelt trägt vorwiegend zu einer Prävention stereotypen Verhaltens bei (Mason et al., 2007; Wiedenmayer et al., 1996). Die alleinige Deckung des Bewegungsanspruchs eines Tieres ist dabei nicht ausreichend. Obwohl in Studien an einem transgenen Mausmodell stereotypes Verhalten durch das Angebot eines Laufrads nahezu verhindert werden konnte (Richter et al., 2008), beeinflusste der kontinuierliche Zugang zum Laufrad die Entwicklung von Stereotypien bei Hirschmäusen (*Peromyscus maniculatus*) nicht (Pawlowicz et al., 2010). Durch die Möglichkeit zur körperlichen Betätigung allein, können Stereotypien demzufolge nicht vermieden werden. Zumal das Laufen in einem Laufrad ebenfalls in einer repetitiven und invarianten Art und Weise ausgeführt, als Substitution anderer Verhaltensweisen verrichtet

wird und deshalb ein stereotyper bzw. suchterzeugender Charakter *per se* nicht ausgeschlossen werden kann (Richter et al., 2014). Die Laufdistanz einer FVB/NJ-Maus von 26,12 km in der Einrichtung der ITK macht deutlich, welches Ausmaß physischer Aktivität stereotype (vor allem *circuit running*) Mäuse verrichten.

6.3 Auswirkungen stereotypen Verhaltens auf die physische Fitness und den metabolischen Phänotyp

Es ist bekannt, dass ein geringes Absatzgewicht zu einer erhöhten Prävalenz stereotypen Verhaltens führt (Würbel and Stauffacher, 1997) und stereotype Tiere generell leichter sind als nicht-stereotype (z.B. Schmoock, 2004). Dennoch geht diese Studie über frühere Erkenntnisse hinaus und erfasst über einen längeren Zeitraum die Körpergewichtsentwicklung und die Körperzusammensetzung nicht-stereotyper und stereotyper Mäuse als Verlauf. In ICR-Mäusen geht die Entwicklung der Stereotypen zeitlich und verhaltensbezogen mit dem Absetzen einher. Vor allem Tiere mit einem geringen Absatzgewicht und vorzeitig abgesetzte Mäuse zeigen direkt nach der Trennung vom Muttertier erhöhte Blut-Corticosteron-Spiegel. Begründet scheint diese Tatsache in einer stressinduzierenden gesteigerten Säugemotivation. Die Jungtiere initiieren mehrere „Ausbruchsversuche“, um zurück zum Muttertier zu gelangen (Würbel and Stauffacher, 1998, 1997).

Auffallend ist, dass FVB/NJ-Mäuse, die im Laufe des Lebens Stereotypen entwickelt haben, bereits im Absatzalter ein geringeres Gewicht aufwiesen, wobei sich die Körperzusammensetzung zu diesem Zeitpunkt noch nicht unterschied. Im Verlauf der gesamten Studie zeigen die Mäuse zu erwartende geschlechterabhängige Gewichtsentwicklungen. Bis auf Versuchswoche zwei und vier, wiesen stereotype Tiere hierbei ein signifikant geringeres Körpergewicht auf, als nicht-stereotype Tiere. Zusätzlich divergierten die Tiere im Verlauf des Projektes zunehmend hinsichtlich ihrer Körperzusammensetzung. Bei stereotypen FVB/NJ-Mäusen machte bei den NMR-Messungen in Versuchswoche sieben und zwölf ein wesentlicher Anteil des Körpers die Muskelmasse aus, wohingegen der Fettanteil geringer ausfiel. Wie die Daten der Verhaltensbeobachtung, den Open Field Tests und der ITK zeigen, weisen stereotype FVB/NJ-Mäuse maßgeblich erhöhte Aktivitätsniveaus auf, die mit einer gesteigerten physischen Betätigung einhergehen (gemessen an den Stereotypie-Levels, der reduzierten Immobilität und den erhöhten zurückgelegten Distanzen). Stereotype Tiere, in dieser Arbeit vor allem die *circuit running* Mäuse, zeichnen sich demnach durch eine gesteigerte körperliche Fitness aus, die sich in der Körpergewichtsentwicklung und der Körperzusammensetzung widerspiegelt. Zudem müssen stereotype FVB/NJ-Mäuse ihren durch die gesteigerte körperliche Aktivität erhöhten Energiebedarf decken. Wie die 12-

Wochen-Verhaltensbeobachtung zeigt, fressen stereotype Mäuse häufiger. Jedoch werden hierbei die einzelnen Futteraufnahmeperioden durch das Ausüben stereotypen Verhaltens unterbrochen. Nicht-stereotype Mäuse hingegen, fressen zwar seltener, aber über einen längeren Zeitraum. Dies ist auch zu den Daten zur Futter- und Trinkwasseraufnahme aus der Messeinrichtung der ITK kongruent. Vergleicht man die tatsächliche Futteraufnahme der Tiere, ergeben sich keine Unterschiede. Demzufolge nehmen stereotype Mäuse die gleiche Menge an Futter auf, obwohl sie sich mehr körperlich verausgaben. Ein weiterer Aspekt, der bei der Interpretation der Daten zur Körpergewichtsentwicklung berücksichtigt werden muss. Je nachdem, wo der Maßstab angesetzt wird, nehmen demzufolge nicht-stereotype FVB/NJ-Mäuse in Anbetracht ihrer reduzierten körperlichen Aktivität verhältnismäßig „zu viel“ Futter auf, setzen sich demzufolge aus einem entscheidenden Körperfettanteil zusammen und wiegen mehr als stereotype Mäuse.

Inwiefern die gesteigerte Tagesaktivität und die vermehrte körperliche Betätigung (im Rahmen der Ausübung des stereotypen Verhaltens und den damit verbundenen zurückgelegten Tagesdistanzen) Einfluss auf Parameter der physischen Fitness auf molekularer und zellulärer Ebene haben, wurde in den sich anschließenden labordiagnostischen Untersuchungen analysiert.

Fette und Kohlenhydrate sind die Haupt-Substrate für die aerobe Adenosin-Triphosphat-Synthese (ATP-Synthese) in der Skelettmuskulatur. Endogene Kohlenhydrate, die hauptsächlich als Muskel- und Leber-Glykogen gespeichert werden, stellen weniger als 5% des Gesamtspeichers eines durchschnittlichen Menschen dar. Die überwiegende Mehrheit der Energiereserven wird als Fett gespeichert, hauptsächlich als Triacylglyceride (TG), welche in subkutanem und tiefviskosem Fettgewebe abgelagert werden. Kleinere Mengen an TG zirkulieren als Lipoproteinpartikel und werden in Lipidtröpfchen (LD) innerhalb der Muskelfasern (intramuskuläre TG) gespeichert (Hoppeler et al., 1985). LD bieten während eines Ausdauertrainings mit moderater Intensität eine wichtige Substratquelle (Sacchetti et al., 2002; van Loon et al., 2003). Sie stellen dabei einen schnell verfügbaren Speicher sequestrierter Fettsäuren dar, welcher der Erhaltung der intrazellulären Energiehomöostase dient. Dieser wird vor allem dann ausgeschöpft, wenn das Energieangebot limitiert ist, die Energiereserven ausgeschöpft sind oder ein erhöhter Energiebedarf besteht (Shepherd et al., 2012). Die Skelettmuskulatur wandelt chemische Energie in mechanische Leistung um, Glykogen stellt hierbei das Hauptsubstrat während intensiven Trainings dar (Hermansen et al., 1967). Glykogen entspricht der Speicherform von Kohlenhydraten in Säugetieren. Beim Menschen werden ca. 80% (ca. 500g) des Glykogens in der Skelettmuskulatur gespeichert. Die Glykogenkonzentration der Leber ist höher, da die Leber jedoch eine geringere Gesamtmasse aufweist, beläuft sich die Glykogenmasse der Leber lediglich auf ca. 100g beim Menschen (Hawley et al., 1997). In

geringen Mengen kommt Glykogen auch im Herzen und im Gehirn vor und stellt hier ein überlebenswichtiges Substrat zur anaeroben Energiegewinnung während kurzzeitigen Sauerstoffdefizits dar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir keine Unterschiede im Glykogengehalt der Leber und im TG-Gehalt des *M. quadriceps* zwischen nicht-stereotypen und stereotypen Mäusen feststellen. Jedoch fanden wir signifikante Unterschiede im Glykogengehalt des Muskels, welcher bei stereotypen Tieren höher war. Eine der Hauptfunktionen des Glykogens ist die Erhaltung einer physiologischen Blutglucose-Konzentration. Jedoch trägt nur das Leberglykogen zur Glucosefreisetzung ins Blut bei. Die Skelettmuskulatur ist aufgrund der fehlenden Glucose-6-Phosphatase nicht dazu in der Lage. Das Glykogen im Muskel deckt überwiegend den Muskeleigenbedarf an Energie während des Trainings und trägt nur wenig zur Aufrechterhaltung der Blutglucose-Konzentration während Fastenperioden bei (Jensen et al., 2011). Die FVB/NJ-Mäuse dieser Studie unterschieden sich weder in der durchschnittlichen Futteraufnahmemenge, noch in der Blutglucose-Konzentration, dementsprechend waren auch keine Unterschiede im Glykogengehalt der Leber festzustellen. Die periphere Lipolyse geschieht nachweislich vorrangig bei Übungen mit geringer Intensität, wohingegen eine Muskel-TG-Lipolyse vermehrt bei Ausdauerübungen höherer Kraft-Intensität stattfindet (van Loon et al., 2003). Da davon auszugehen ist, dass sich stereotype Mäuse mit der Ausübung stereotypen Verhaltens zwar physisch betätigen, aber nicht all ihre Kraftreserven ausschöpfen, könnte dies eine Erklärung für die nicht vorhandenen Unterschiede im TG Gehalt des Skelettmuskels sein.

Mit steigender Intensität (verlängerte Dauer und erhöhte investierte Anstrengung) des Trainings, nehmen auch die Gewebeaufnahme der Glucose aus dem Plasma und die Glykogen-Oxidation im Muskel zu (Romijn et al., 1993). Die erhöhten Glykogengehalte des *M. quadriceps* stereotyper Mäuse sind als ein Trainingseffekt zu werten. In Abhängigkeit der Form der Stereotypie verbrachten die FVB/NJ-Mäuse ca. 10-29% ihrer aktiven Zeit mit der Ausübung stereotypen Verhaltens. Wie man auch an der Körpergewichtsentwicklung und am erhöhten Muskelanteil der Körperzusammensetzung stereotyper Mäuse erkennt, scheint diese körperliche Betätigung zu der Ausprägung gesteigerter physischer Fitness und einem damit verbundenen metabolischen Phänotyp einherzugehen. Es ist bekannt, dass der Glykogengehalt der Skelettmuskulatur nach anhaltendem Training zunimmt (Burgomaster et al., 2008) und trainierte Personen gesteigerte Glykogengehalte im Skelettmuskel aufweisen (Hickner et al., 1997). Auch bei Ratten konnte nachgewiesen werden, dass einen Tag nach dem Training der Glykogengehalt im Skelettmuskel erhöht war und dass sich dieser Effekt als noch prägnanter herausstellte, wenn sie freien Zugang zu Futter und mit Glucose-versetztem Trinkwasser hatten (Hespel and Richter, 1990).

Im Rahmen der histologischen Analysen sollte geklärt werden, inwiefern auch Parameter auf zellulärer Ebene auf einen Trainingseffekt stereotypen Verhaltens hindeuten. Ursprünglich wurden Muskelfasern auf immunhistochemischer Grundlage in drei Typen klassifiziert: I, IIa und IIb (und IIc als Hybridform). Bei Nagetieren wurde anschließend eine vierte Form (IIx) basierend auf monoklonalen Antikörpern gegen Myosin-Heavy-Chain (Schwere-Kette-Myosin; MyHC) identifiziert. Humane Muskelfasern, die zuvor als IIb klassifiziert wurden, konnte ein MyHC-Gen nachgewiesen werden, das homolog zu dem IIx-Gen bei Nagern ist. Daher werden menschliche Fasertypen derzeit als I, IIa und IIx eingeteilt. Neben MyHC kommt eine Vielzahl weiterer kontraktile und strukturelle Proteine in verschiedenen Isoformen vor, deren Expression mehr oder weniger eng mit Fasertypen zusammenhängt. Insgesamt werden zehn verschiedene MyHC-Gene mit dem Skelettmuskel verbunden (Gundersen, 2011).

MyHC Typ	Kontraktionsdauer (Twitch)	Verkürzungsgeschwindigkeit	Querschnittsfläche	Stoffwechsel	Ausdauer	Leistungsfähigkeit
I	Langsam 	Langsam 	Klein 	Oxidativ 	Hoch 	Hoch 
IIa					Gering 	Gering 
IIx						
IIb						
Schnell						

Abb. 6-1: Eigenschaften der vier Haupt-Muskelfaser-Typen der Säugetiere. Modifiziert nach Gundersen 2011. (MyHC = Myosin Heavy-Chain)

Basierend auf der Analyse physiologischer und histochemischer Eigenschaften einzelner motorischer Einheiten (Kontraktionsdauer, Verkürzungsgeschwindigkeit, Querschnittsfläche, Stoffwechsel, Ausdauer, Leistungsfähigkeit) können diese in verschiedene, weitgehend nicht überlappende Gruppen (I-IIb) kategorisiert werden. Jedoch können sich die physiologischen Eigenschaften von Einheiten desselben histochemischen Typs zwischen den verschiedenen Muskeln unterscheiden (Burke, 1967). Für die Analysen im Rahmen dieser Arbeit haben wir den *M. soleus* als Prototyp der roten Slow-Twitch Muskelfasern (MyHC Typ I) ausgewählt. Dieser Muskel zeichnet sich durch langsam kontrahierende Fasern aus, die zwar verzögert auf Reize reagieren, aber auch erst später ermüden. Muskelfasern dieses Typs werden vor allem durch Ausdauersport trainiert (Burke et al., 1974). Der *M. quadriceps* hingegen setzt sich hauptsächlich aus den weißen Fast-Twitch Muskelfasern (MyHC Typ IIb, bzw. IIx) zusammen. Sie ermöglichen eine schnelle Reaktion auf Reize und eine enorme Krafterzeugung, ermüden jedoch schnell. Muskelfasern dieses Typs sind vor allem in der Muskulatur von Sprintern sehr ausgeprägt vorhanden. Unabhängig vom Typ der Muskelfasern, entwickelt die Muskulatur als Anpassungsreaktion an eine erhöhte physische Beanspruchung eine Hypertrophie. Eine

Muskelhypertrophie ist gekennzeichnet durch eine Zellvolumenzunahme, die durch die zunehmende Anzahl an Myofibrillen, Mitochondrien und Zellkernen (Myonuclei) bedingt ist (Seiden, 1976).

Zur Analyse einer potentiellen, durch das Ausüben stereotypen Verhaltens bedingten, muskulären Hypertrophie, wurden maßgebende Parameter auf zellulärer Ebene erfasst. Stereotype FVB/NJ-Mäuse unterschieden sich nicht von nicht-stereotypen FVB/NJ-Mäusen hinsichtlich der Gesamtquerschnittsfläche des *M. soleus*, der Anzahl der Myozyten/Muskelquerschnitt (*M. soleus*) und des durchschnittlichen Durchmessers der Myozyten des *M. soleus* und des *M. quadriceps*. Die Durchmesser der Myozyten sind geschlechtsbedingt bei weiblichen Tieren geringer als bei männlichen Tieren. Es zeigen sich allerdings keine Unterschiede in Abhängigkeit des stereotypen Verhaltens. Aufgrund der divergierenden Glykogengehalte des *M. quadriceps* ist dennoch von einer Art „Trainingseffekt“ bei stereotypen FVB/NJ-Mäusen durch die erhöhte physische Aktivität auszugehen. Jedoch scheint die körperliche Betätigung ein gewisses Maß, das potentiell zu einer Hypertrophie führen würde, nicht zu übersteigen.

Bei der finalen Organentnahme stellten sich signifikante Unterschiede in den Gewichten verschiedener Organe heraus. Im Verhältnis zum Körpergewicht hatten stereotype Mäuse relativ erhöhte Gewichte des Herzens, der Milz, des Gehirns und der Leber. Das relative Gewicht des braunen Fettgewebes unterschied sich nicht zwischen den Gruppen.

Da sich der Unterschied im relativen Herzgewicht besonders prägnant zwischen *circuit running* Mäusen und nicht-stereotypen Mäusen darstellte, könnte das erhöhte relative Herzgewicht stereotyper Tiere ein Zeichen einer (durch die immens gesteigerten täglich zurückgelegten Distanzen) Trainings-induzierten Herzhypertrophie sein. Die Herzhypertrophie ist gekennzeichnet durch eine Vergrößerung oder Verdickung des Myokards, welche sich durch eine Zunahme der Kardiomyozytengröße und durch Veränderungen in anderen Herzmuskelkomponenten, wie z. B. der extrazellulären Matrix, ergibt. Die Ursachen einer Herzhypertrophie können physiologisch sein, wie z.B. bei gesteigerter physischer Aktivität eines Athleten oder pathologischen Ursprungs, wie z.B. bei Herzklappenerkrankungen oder Bluthochdruck. Jedoch bleibt die Datenlage bezüglich histologischer Parameter zur Beurteilung einer hypertrophen Kardiomyopathie inkongruent. Während sich viele Autoren einig sind, dass makroskopische Analysen zu einer klaren Abgrenzung zwischen nicht-hypertroph und hypertroph führen (Pluim et al., 2000), sind histomorphometrische Messungen keine geeigneten Indizes. Kardiale Hypertrophien werden makroskopisch geprägt durch eine Zunahme der Dicke der Ventrikelwände (bei linksventrikulärer Hypertrophie ist vornehmlich der linke Ventrikel betroffen, bei der globalen Hypertrophie beide Ventrikel) und/oder des interventrikulären

Septums (Gielen et al., 2010). Während manche Studien belegen, dass Training histologisch zu einer Zunahme der Breite und Länge von Kardiomyozyten führt und kardiale Hypertrophie mit einer Zunahme der Größe der Kardiomyozytenzellkerne einhergeht, konnten diese Fakten nicht in allen Studien reproduziert werden. In einer Dissertation zur Analyse histomorphometrischer Parameter zur Evaluierung der hypertrophen Kardiomyopathie der Katze wurde herausgearbeitet, dass sich in den durchgeführten histologischen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der maximalen und minimalen Durchmesser sowie der Querschnittsflächen der Kardiomyozyten und/oder ihrer Kerne ergaben, obwohl diese Veränderungen im Zusammenhang mit hypertropher Kardiomyopathie beim Menschen diskutiert werden. Zudem konnte bei Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie keine Myokardfibrose festgestellt werden. Das Aufstellen eines Grenzwertes einer Hypertrophie war demzufolge anhand histomorphometrischer Parameter allein nicht möglich (Heblinski, 2010).

Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten erhöhten relativen Herzgewichte stereotyper FVB/NJ-Mäuse konnten mit Hilfe histologischer Parameter nicht als Zeichen einer Hypertrophie oder Myokardfibrose gewertet werden. Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich des Kollagenanteils (als Indikator einer Myokardfibrose), der Querschnittsflächen der Kardiomyozyten und der durchschnittlichen Kardiomyozytendurchmesser (als Indikatoren einer Hypertrophie) der linken Ventrikelwand zwischen nicht-stereotypen und stereotypen FVB/NJ-Mäusen. Bei Untersuchungen zur Mongolischen Wüstenrennmaus ergaben sich bei den Tieren, die ohne Nestmöglichkeit gehalten wurden, erhöhte Stereotypieprävalenzen. Bei diesen stereotypen Tieren wurden ebenfalls erhöhte relative Herzgewichte festgestellt. Diskutiert wurde im Rahmen dieser Untersuchung, dass Tiere, die in einer restriktiven Umwelt gehalten werden, einem Zustand chronischen Stress ausgesetzt werden. Chronischer Stress wiederum kann zu einer Steigerung des Blutdrucks führen und kann die damit verbundene Erhöhung des relativen Herzgewichts erklären (Pinto and Enroth-Cugell, 2000), jedoch wurden im Rahmen dieser Untersuchungen keine weiterführenden histologischen Analysen durchgeführt.

Stereotype FVB/NJ-Mäuse zeigten ein erhöhtes relatives Milzgewicht gegenüber nicht-stereotypen Mäusen. Der Unterschied stellte sich als besonders eindeutig für Mäuse heraus, die das *circuit running* ausübten. Tiere, die diese Form der Stereotypen zeigen, legten im 24 Stunden Open Field Test signifikant weitere Distanzen als nicht-stereotype Mäuse zurück. Diese körperliche Betätigung hat diverse metabolische Konsequenzen. Das erhöhte relative Milzgewicht stereotyper FVB/NJ-Mäuse könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die gesteigerte physische Fitness stereotyper FVB/NJ-Mäuse mit einem vergleichsweise leistungsfähigeren Immunsystem einhergeht.

Als Marker einer möglichen gesteigerten Replikations-, bzw. Proliferationsrate innerhalb der Milz, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) bestimmt. PCNA ist ein 36kD schweres nukleäres Protein, das in diversen humanen Zelltypen, sowie bei Mäusen, Vögeln und Hamstern nachgewiesen wurde. Es handelt sich hierbei um ein Hilfsprotein, das die DNA während der Replikation ringförmig umgibt. Es wird als Co-Faktor der DNA-Polymerase δ während der DNA-Synthese und DNA-Reparatur exprimiert (Shivji et al., 1992). Differenzieren kann man hierbei zwei Formen von PCNA: Die Form, die vor allem bei der DNA-Reparatur zum Tragen kommt, befindet sich in sehr niedrigen Konzentrationen in ruhenden Zellen. Die andere Form ist vorrangig an Orten der Replikation (also im Zellkern) lokalisiert und vermehrt sich stark während des Zellzyklus. Die genaue Rolle des PCNA während des Zellzyklus ist weiterhin unklar, jedoch scheint es die Replikation in der S-Phase erst zu ermöglichen. Das für die DNA-Synthese verantwortliche PCNA wird über die G1-Phase bis hin zur S-Phase verstärkt exprimiert, wohingegen die Konzentration während der G2- und der M-Phase sehr niedrig ist (Dietrich, 1993). Neben dem Einsatz in der Tumordiagnostik (z.B. Barboza et al., 2005), findet die Analyse des PCNA vor allem als potentieller Proliferationsmarker Verwendung (z.B. Kubben et al., 1994; Paulo et al., 2013). Die Analyse der Milzproben der FVB/NJ-Mäuse dieser Studie ergaben keine Unterschiede in der PCNA-Expression zwischen nicht-stereotypen und stereotypen FVB/NJ-Mäusen. Das erhöhte relative Milzgewicht stereotyper Mäuse scheint also nicht in einer unspezifischen Zellproliferation begründet zu sein.

Es ist bekannt, dass moderates Training enormen Einfluss auf das Immunsystem hat und darüber hinaus zu einer Verjüngung des Immunsystems alternder Individuen hat (Simpson et al., 2012). Insbesondere hat sich gezeigt, dass intensives Ausdauertraining wie Laufen, Schwimmen, Radfahren oder Rudern eine Leukozytose hervorruft, die mit einer Neutrophilie, B- und T-Lymphozytose und gesteigerter Zirkulation Natürlicher Killerzellen assoziiert ist. Die durch moderates Training geförderte Immunabwehr führt sogar zu einer verstärkten Resistenz gegenüber Influenza-Viren bei Mäusen (Lowder et al., 2005). Geht man also davon aus, dass das Ausüben stereotypen Verhaltens, insbesondere des *circuit runnings*, kontinuierliches Training für die Tiere bedeutet, könnte dies einen immunologischen Vorteil für stereotype Tiere nahelegen. Um diese Hypothese abschließend zu klären, könnte eine detaillierte Charakterisierung des Immunsystems Aufschluss geben und demzufolge eventuell das erhöhte relative Milzgewicht erklären.

Die erhöhten relativen Lebergewichte stereotyper FVB/NJ-Mäuse konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Es wurden keine weiterführenden histologischen Untersuchungen durchgeführt. Auch der Unterschied des relativen Gehirngewichts bleibt unbegründet. Zwar stellte sich heraus, dass es bei stereotypen

FVB/NJ-Mäusen signifikant höher ist, dennoch gab es keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der Form der Stereotypie.

6.4 Auswirkungen stereotypen Verhaltens auf das Wohlbefinden von Tieren

Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszuarbeiten, inwiefern Tiere, die stereotypes Verhalten ausüben, in ihrem Wohlbefinden beeinträchtigt sind oder sogar leiden. Nach dem Bedarfsdeckungs- und Schadensvermeidungskonzept von TSCHANZ (Tschanz, 1985) sind die Grundeigenschaften des Lebens Selbstaufbau, Selbsterhaltung und Reproduktion. Um sich selbst zu erhalten, muss ein Individuum fähig sein, das Aufgebaute vor Zerstörung zu bewahren. Somit ist die Fähigkeit zur Schadensvermeidung Voraussetzung für die Selbsterhaltung. Zur Selbsterhaltung werden darüber hinaus diverse Stoffe, Reize und Bedingungen, die zum Gelingen der Entwicklung erforderlich sind, benötigt. Da kein Individuum in der Lage ist, all diese essentiellen Ressourcen selbst herzustellen, wird ein gewisser Bedarf hervorgerufen. Ein Individuum nutzt seine Sinne, um bestimmte bedarfsdeckende Objekte oder Situationen, die Nutzen bringen können, zu erkennen. Mit dem Suchen, Erkennen und Nutzen ist somit eine spezifische Verhaltensweise und zielgerichtetes Handeln verbunden. Die Grundfunktionen jedes Verhaltens sind zusammengenommen eine optimale Bedarfsdeckung und maximale Schadensvermeidung. Können diese Grundfunktionen nicht gedeckt werden, scheint der Aspekt des Leidens gegeben zu sein. Stereotypen werden schon seit vielen Jahren als Indikatoren für suboptimale Haltungsbedingungen (Broom, 1986; Hediger, 1950), eingeschränktes Wohlbefinden (Fraser and Broom, 1997b; Hewson, 2003; Wiepkema, 1983) und Stress (Vestergaard, 1981) beschrieben. Diese Ansicht basiert auf mehreren Merkmalen stereotypen Verhaltens: dem Kontext, in dem es entsteht; den Verhaltensmustern, aus denen es sich entwickelt; den Faktoren, die dessen Entwicklung beeinflussen und der Tatsache, dass manche Stereotypen auch selbst-verletzend sind. Situationen, in denen ein Tier hoch motiviertes Verhalten ausleben möchte (wie z.B. Fortpflanzung), dazu aber nicht in der Lage ist (weil es z.B. in gleichgeschlechtlichen Gruppen gehalten wird), führt zur Frustration. Diese Frustration kann sich wiederum in umgelenkten Verhaltensweisen, Ersatzhandlungen oder Stereotypen widerspiegeln (Mason, 1991). Unvermeidbarer Stress oder Angst, mangelnde Stimulation und restriktive physikalische Komplexität sowie kognitive und räumliche Einschränkungen werden kontrovers als Ursachen stereotypen Verhaltens diskutiert. In den meisten Fällen deutet das Auftreten von Stereotypen auf ein erhöhtes Risiko beeinträchtigten Wohlbefindens und damit verbundenen Leidens hin (Broom, 1991; Dantzer, 1991; Dawkins, 2008; Mason, 1991). Stereotypen werden aber nicht immer mit eingeschränktem Wohlbefinden in Verbindung gebracht. In einer Übersicht von 286 Stereotypie-bezogenen Publikationen von 1985-2004, die GJ MASON zusammengestellt hat, berichteten 153 Veröffentlichungen von Zusammenhängen

stereotypen Verhaltens mit eingeschränktem Wohlbefinden. Das heißt, Stereotypien entstanden in Situationen von Stress, Angst oder Depression. Allerdings stellten 133 dieser Publikationen keinen Bezug zu verringertem Wohlbefinden her oder indizierten sogar gesteigertes Wohlergehen (Mason and Latham, 2004). Dies deutet darauf hin, dass manche Stereotypien unter Umständen eine Problemlösung darstellen und dazu beitragen, mit an sich unlösbaren Belastungen umzugehen. Bei der Beantwortung der Frage ob Stereotypien als Indikatoren für Leiden und beeinträchtigt Wohlbefinden bei Tieren dienen, sind also diverse Aspekte zu beachten. Eine große Rolle spielt dabei der Faktor „Zeit“. Da sich Stereotypien typischer Weise in Entwicklungsstufen herausbilden und sich in letzter Instanz vom ursprünglichen Auslöser loslösen und emanzipieren (Kapitel 2.10), werden Stereotypien auch dann gezeigt, wenn der ursprüngliche Stimulus, der zur Entstehung des Verhaltens geführt hat, verändert oder entfernt wird. Stereotypien sind somit nicht immer Indikatoren für eine derzeit bestehende Situation, sondern können auch auf zurückliegende Diskrepanzen, Einschränkungen oder Traumata hinweisen. Stereotypien entwickeln sich zeitabhängig, wobei das Quellverhaltensmuster (*source behaviour*) an Wiederholungen, Frequenz und Dauer der Ausführung zunimmt (Wiedenmayer, 1997; Würbel and Stauffacher, 1996). Dies ist in der Regel mit einer progressiven Limitierung des Verhaltensrepertoires und abnehmender Flexibilität der stereotypen Sequenzen assoziiert (Baker et al., 1983).

Diese Einengung des Verhaltensrepertoires konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Im Rahmen der 12-wöchigen Beobachtung stellte sich heraus, dass stereotype FVB/NJ-Mäuse weniger kletterten, gruben und knabberten bzw. nagten als die nicht-stereotypen Mäuse. Außerdem zeigten sie auch weniger „anderes Verhalten“, hier wurde Schnüffeln, Laufen, den Käfig Erkunden, Trinken, Urinieren und Kotabsatzverhalten zusammengefasst. Die Ausübung des stereotypen Verhaltens führte also zu einer Beschränkung der gezeigten Verhaltensweisen und erfolgte auf Kosten der Inaktivität. Stereotype FVB/NJ-Mäuse verbrachten wesentlich mehr Zeit mit aktiven Verhaltensweisen, anstatt zu schlafen oder sich auszuruhen.

Wildtiere, die in künstlichen Haltungsbedingungen untergebracht werden, tendieren in dieser Umgebung zu einer erhöhten Inaktivität. Das gilt vor allem für viele Spezies, die in Zoos gehalten werden (Meyer-Holzappel, 1968). In einer Studie zum Verhalten von Wildfängen Afrikanischer Striemen-Grasmäuse stellte sich heraus, dass die vormals freilebenden Tiere auf die artifizielle Umgebung mit einer erhöhten Stressanfälligkeit und Ängstlichkeit reagieren und die damit verbundene erhöhte Inaktivität ein Anzeichen beeinträchtigten Wohlergehens sein kann (Jones et al., 2011). Die Arbeitsgruppe um Carole Fureix fand heraus, dass C57BL/6 und DBA/2-Mäuse individuell und stammabhängig unterschiedlich auf restriktive Haltungsbedingungen reagieren. Sie entwickeln stereotypes

Verhalten oder sie verharren vermehrt im „*awake-but-motionless*“-Zustand. Das heißt, die Tiere sind zwar wach, verbringen diese Zeit aber nicht mit aktiven Verhaltensweisen, sondern halten sich bewegungslos im Käfig auf. Wobei Tiere, die am wenigsten stereotypes Verhalten zeigten, am meisten wach, aber regungslos waren. Diese Tiere reagierten außerdem mit einer erhöhten Immobilität im forcierten Schwimm-Test. Der forcierte Schwimm-Test stellt für die Tiere eine ausweglose Situation dar. Nachdem sie in ein zylindrisches, wassergefülltes Glas ohne Plattform verbracht werden, wird die Zeit bis zu dem Punkt gemessen, an dem die Tiere „resignieren“ – also bis sie aufhören, mit schwimmenden Bewegungen aus dem Zylinder gelangen zu wollen. Eine zeitige Immobilität spricht für einen negativen emotionalen Zustand und ist ein Indikator für eine depressive Grundstimmung. Sie postulierten somit, dass „wach, aber bewegungslos“ zu sein eine Reaktion auf restriktive, nicht-angereicherte Haltungsbedingungen ist, eine Alternative zu stereotypem Verhalten darstellt und depressionsähnliche Zustände widerspiegeln kann (Fureix et al., 2016).

Es kann also ebenso vermutet werden, dass die nicht-stereotypen FVB/NJ-Mäuse, die signifikant mehr inaktive Phasen zeigten, diejenigen sind, die durch die Einzelhaltung und die Haltung unter nicht-angereicherten Bedingungen vergleichsweise mehr leiden.

Zur Beurteilung eines potentiellen Leidens durch die Ausübung von Stereotypen kann auch die Herabregulierung der HPA-Achse in Betracht gezogen werden. Wenn man der Coping-Hypothese folgt, ist die Entstehung stereotypen Verhaltens darauf zurückzuführen, dass ein Individuum aktuell oder in der Vergangenheit immensen Stress durch Reaktionen auf die eigene Haltungsumwelt erfährt bzw. erfuhr (Kapitel 2.10). Das physiologische Konzept des Stresses beinhaltet dabei die Interaktion zwischen externen Ereignissen (Stressoren) und individuellen Prädispositionen (bestimmt durch genetische Faktoren und frühe Erfahrungen), die messbare Stressreaktionen hervorrufen (Ladewig et al., 1993). Weil während der Konfrontation mit diversen Stressoren konsequent die Cortisolproduktion (bzw. bei Nagetieren vorrangig die Corticosteronproduktion) angeregt wird, wurden Plasmacortisolkonzentrationen und fäkale Corticosteronlevels häufig verwendet, um die Stressreaktionen bei diversen Spezies zu charakterisieren. ICR-Mäuse, die bereits an Tag 17 abgesetzt wurden und Tiere mit sehr niedrigem Absatzgewicht, die zu erhöhten Stereotypie-Levels neigten, zeigten 48 Stunden nach dem Absatz erhöhte CST-Blutwerte, am 30. Lebensstag gab es allerdings keinen Unterschied mehr im Vergleich zu den Tieren, die mit einem höheren Gewicht an Tag 21 abgesetzt wurden (Würbel and Stauffacher, 1997). In einem Versuch, in dem selektiv für eine niedrige, intermediäre und hohe Stressreaktivität gezüchtete Mäuse einem speziellen Stressreaktivitätstest unterzogen wurden, zeigten Mäuse mit einer intermediären Stressreaktivität erhöhte Stereotypie-Levels. Die Entwicklung stereotypen Verhaltens scheint also weniger eine Frage der

individuellen akuten Stressantwort (Erhöhung der CST-Werte in Folge einer stressigen Situation) zu sein, sondern viel mehr der Möglichkeit zur Wiederherstellung der CST-Basalwerte nach der Konfrontation mit einem Stressor (*recovery*) (Engel et al., 2011). Allerdings gibt es auch Studien, die keine Unterschiede in der CSL oder CST Werten zwischen stereotypen und nicht-stereotypen Tieren feststellten (Fureix et al., 2013) oder sogar erhöhte fäkale CST Basalwerte in Tieren, die stereotypes Verhalten zeigen, fanden.

Im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit wurden über den gesamten Versuchszeitraum hinweg fäkale Proben gesammelt und auf ihren Cortisol- und Corticosterongehalt hin analysiert. Einen Unterschied konnte man bei den fäkalen Corticosteronwerten in Versuchswoche drei verzeichnen. Hier zeigten die nicht-stereotypen FVB/NJ-Mäuse erhöhte Corticosteronwerte. Nach Ausschluss möglicher technischer Unterschiede während der Sammlung oder der Bearbeitung der Proben, bleibt diese Tatsache ungeklärt. Wie die Ergebnisse des ersten und zweiten Open Field Tests zeigen, verhalten sich stereotype FVB/NJ-Mäuse in unbekanntem Situationen vermehrt ängstlich. Sie könnten demnach in Situationen, mit denen sie erstmal konfrontiert werden auch mehr Stress erfahren und entsprechend erhöhte Corticosteronlevels aufweisen. Die Tiere dieser Studie wurden nach Absatz in Einzelhaltung verbracht, obwohl sie zuvor in Gruppenhaltung aufgezogen wurden (mit dem Muttertier und den Geschwistertieren zusammen). Die erhöhten Corticosteronwerte stereotyper Tiere in Versuchswoche drei könnten demzufolge Ausdruck der anhaltenden Adaptationsphase stereotyper FVB/NJ-Mäuse sein. Wobei unklar bleibt, warum sich die Levels in Versuchswoche eins und zwei nicht entsprechend unterschieden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass bekanntermaßen unmittelbar vor Entwicklung des stereotypen Verhaltens z.T. die Konzentrationen der Stresshormone erhöht sind (Mcbride and Cuddeford, 2001). Allerdings handelt es sich bei den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Unterschieden um die Corticosterongehalte der Tiere in Lebenswoche sechs. Der durchschnittliche Beginn des stereotypen Verhaltens bei den FVB/NJ-Mäusen dieser Studie fand jedoch in Lebenswoche acht statt. Generell konnten relativ ausgeprägte Standardabweichungen bei den fäkalen Cortisol- und Corticosteronwerten ermittelt werden, die die statistische Aussagefähigkeit beeinflussen. Um einen möglichst umfassenden, durch die Probennahme an sich ungestörten, Überblick über die Hauptstresshormone der Mäuse (Corticosteron und Cortisol) zu bekommen, orientierte sich die fäkale Probensammlung dieser Studie an Protokollen, die aus der Forschung an Wildtieren bekannt sind (siehe Kapitel 4.4.1). Durch die Bestimmung der Glucocorticoide aus Fäzessammelproben lässt sich weniger eine Aussage über den Glucocorticoidspiegel zu einem definierten Zeitpunkt treffen, es ermöglicht jedoch die Erfassung eines zeitlichen Verlaufs als Gesamtüberblick. Es gibt diverse Faktoren, die die Validität dieser Methode beeinflussen. Die fäkalen Pellets wurden als zufällig ausgewählte Probe aus dem Käfig entnommen. Hierbei konnte zum Zeitpunkt der Probennahme nicht mehr unterschieden

werden, zu welchem Tageszeitpunkt das Pellet abgesetzt wurde und ob es eventuell mit Urin kontaminiert war. Laut einer Übersichtsarbeit von PALME (Palme, 2005) können dies Faktoren sein, die den fäkalen Glucocorticoidgehalt mitbestimmen. PALME arbeitete auch heraus, dass frische Kotproben und getrocknete Kotproben im Glucocorticoidgehalt korrelieren, zumindest wenn die folgenden Verarbeitungsschritte standardisiert erfolgen. Bei der Sammlung der fäkalen Proben dieser Arbeit wurde darauf geachtet, ausschließlich bereits getrocknete Fäkalpellets zu wählen und diese direkt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern, um die Aktivität bakterieller Enzyme möglichst gering zu halten. Die Probenaufbereitung erfolgte ebenfalls nach einem Protokoll, das für alle Proben identisch war. Somit stellte die eingeschränkte Möglichkeit die Kotproben entsprechend ihres „Alters“ bzw. ihrer Frische zu unterscheiden, den limitierenden Faktor während der Analyse der fäkalen Glucocorticoidgehalte dar. Um die Methode zuverlässig zu validieren und die Reproduzierbarkeit möglicherweise zu erhöhen, sollte die direkte Probenaufbereitung und Analyse von Frischkot der einer Sammelprobe getrockneter Fäzes aus dem Käfig gegenübergestellt werden. Zusammengefasst konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise zur Bestätigung der Coping-Hypothese gefunden werden. Gemessen an den fäkalen Glucocorticoiden lässt sich also festhalten, dass die vorherrschenden Haltungsbedingungen weder bei stereotypen, noch bei nicht-stereotypen FVB/NJ-Mäusen eine prägnante Stressantwort auszulösen scheinen.

Zudem kann die (in manchen Fällen) durch stereotypes Verhalten ausgelöste Aktivierung des Belohnungssystems und der damit verbundene Einfluss der Neurotransmitter Serotonin (5-HT) und Dopamin (DA) als Zeichen verringerten Leidens interpretiert werden. Es ist möglich, durch spezifische Gehirn-Catecholamin-Modulationen Stereotypen in normalerweise nicht-stereotypen Nagetieren zu modulieren. DA-Agonisten induzieren Stereotypen (z.B. Vandebroek and Odberg, 1997), wohingegen sie sich mit DA-Antagonisten aufheben lassen (z.B. Kjaer et al., 2004).

Dopamin stellte sich als der Hauptneurotransmitter heraus, der an der Entstehung und Erhaltung stereotypen Verhaltens beteiligt zu sein scheint. Bereits im Jahr 1874 zeigte HARNACK (Harnack, 1874), dass „zwanghaftes Knabbern“ beim Kaninchen durch Apomorphin auslösbar ist. Später stellte sich heraus, dass Apomorphin zu den DA-Agonisten gehört. Seitdem haben multiple Studien die Induktion stereotypen Verhaltens durch Verabreichung von DA-Agonisten bestätigt. Die ausgelösten Stereotypen ähneln dabei phänotypisch umweltbedingten (spontane) Stereotypen, wie sie bereits für mehrere Tierarten beschrieben waren (Cooper and Dourish, 1990). DA steuert die Feinmotorik und sorgt für psychischen Antrieb, Wohlbefinden, Lebensfreude und Konzentrationsfähigkeit. Darüber hinaus wird DA eine wichtige Rolle bei der Motivation zugeschrieben: es gilt als Belohnungssystem, das bei Tier und Mensch überlebensdienliche Verhaltensweisen verstärkt. Außerdem ist DA wesentlich an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus' und

der Thermoregulation beteiligt (Dantzer, 1991; Eban-Rothschild et al., 2016; Wise, 2004). Dopaminhaltige Zellen finden sich vielerorts im Zentralnervensystem. Zwei dopaminerge Neuronengruppen haben dabei eine besondere Bedeutung. Eine entspringt der aus dem ventralen Tegmentum und projiziert zum Nucleus accumbens, zum olfaktorischen Tuberculum, der Amygdala und dem Hippocampus und bildet das mesokortikolimbische System, das vor allem die Motivationskomponente regelt. Die zweite Neuronengruppe stellt das nigrostriatale System dar und ist maßgeblich an der Koordination der willkürlichen Motorfunktion beteiligt. Neuronen dieses Systems entspringen der Substantia nigra pars compacta (SNpc) und ziehen ins Striatum (bei Nagern genauer: in das Putamen, Nucleus caudatus).

Serotonin, auch 5-Hydroxytryptamin (5-HT), ist auch außerhalb des zentralen Nervensystems weit verbreitet. Die enterochromaffinen Zellen des Darms enthalten in etwa 90% des Gesamtgehalts an Serotonin. Periphere serotoninerge Neurone befinden sich hauptsächlich im Darm, in Blutgefäßen und im Herzen. Als zentraler Neurotransmitter ist Serotonin nur in Neuronen nachweisbar, deren Zellkörper in den Raphekernen im Hirnstamm sitzen. Von dort innervieren sie mit ihren Axonen praktisch alle Regionen des Gehirns. SRT ist an zahlreichen zentralnervösen Funktionen beteiligt, hat wichtige Herz-Kreislauffunktionen (z.B. Vasokonstriktion, Senkung des Sympathikotonus, Hämostase), beeinflusst die Magen-Darm-Motilität und intestinale Flüssigkeitssekretion. Darüber hinaus reguliert SRT kognitive und emotionale Verhaltensweisen, hat einen entscheidenden Einfluss auf die Stimmung, regelt die circadiane Rhythmik und spielt eine immense Rolle bei der Schmerzwahrnehmung und -verarbeitung. SRT-Dysbalancen können auf der einen Seite zu Unruhe und Halluzinationen und auf der anderen Seite zu depressiven Verstimmungen, Angst und Aggressionen führen. Der vorwiegende Teil, des bezüglich der Rolle von SRT bei der Entstehung von Stereotypen Bekannten, beruht auf Studien zu pharmakoinduziertem Verhalten (Barwick et al., 2000; Canal et al., 2015; Proietti Onori et al., 2014; Yeghiayan and Kelley, 1995). Diverse Studien beschreiben Effekte von 5-HT-Wiederaufnahmehemmern, wie Fluoxetin, auf die Entwicklung stereotypen Verhaltens (Hugo et al., 2003; Poulsen et al., 1996; Wynchank and Berk, 1998). Wobei der Effekt abhängig vom Stereotypie-Level ist. Eine Studie an Rötelmäusen zeigte einen Stereotypie-induzierenden Effekt bei Tieren mit einem geringen Stereotypie-Level, aber einen hemmenden Effekt bei hoch-stereotypen Mäusen (Ödberg and Mers, 1998). Clozapin ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Neuroleptika, welcher Dopamin Rezeptoren blockiert und als partieller 5-HT Antagonist agiert. Citalopram ist neben Fluoxetin ein weiterer Arzneistoff aus der Gruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer. Schönecker und Heller fanden heraus, dass Clozapin keine Wirkung auf Stereotypen unter ungestörten Bedingungen hat, weder in männlichen noch in weiblichen Tieren. Außerdem stellte sich heraus, dass auch Citalopram unter ungestörten Bedingungen stereotypes Verhalten nicht

beeinflusst. Allerdings verminderte Citalopram die, nach akutem Stress üblicherweise erhöhten, Stereotypie-Level. In einer zusätzlichen Studie ergab sich zudem ein Geschlechtsunterschied bei der Behandlung von Stereotypen mit Citalopram. Die durch die Citalopram-Behandlung begünstigte 5-HT-Neurotransmission verminderte die Ausübung bereits entwickelter Stereotypen bei weiblichen, nicht jedoch bei männlichen, Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass bereits etablierte Stereotypen bei weiblichen Mäusen mit einer relativ verminderten serotonergen Funktionsweise einhergehen (Schoenecker et al., 2003; Schoenecker and Heller, 2001).

Es wurden diverse Tiermodelle etabliert, um Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Prozesse humaner mentaler Beeinträchtigungen, stereotype Verhaltensweisen miteinbegriffen, zu erlangen. Bei der Mehrheit dieser Modelle handelt es sich um pharmakologisch-induzierte Stereotypen bei Labornagern. Allerdings wird diskutiert, ob möglicherweise verschiedene Mechanismen oder Entwicklungspfade bei pharmakologisch-induzierten bzw. spontanen Stereotypen existieren. Demzufolge stellen Modelle, die rein auf pharmakologisch-induzierten Stereotypen beruhen, keine ideale Grundlage zum Verständnis spontaner Stereotypen bei Menschen und Tieren dar (Vandebroek et al., 1998). In einer Studie aus dem Jahr 1999 wurden im Corpus Striatum (Nucleus caudatus und Putamen) die Dichte der D₁- und D₂-Rezeptoren mittels Radioligand Bindungsassay und die Konzentration an Serotonin und Dopamin und seiner Metaboliten, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA), mit einer HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) analysiert. Abhängig davon ob die Tiere in angereicherten oder kargen Käfigen aufgezogen wurden oder Stereotypen entwickelten oder nicht, wurden hier keine Unterschiede in den besagten Rezeptordichten und Neurotransmitterkonzentrationen gefunden (Powell et al., 1999). Diese Ergebnisse konnten ebenfalls in einer weiteren Studie nachvollzogen werden. Dabei ergaben sich mittels LC-MS-Bestimmung keine Unterschiede im Dopamin-, DOPAC- und HVA-Gehalt des frontalen Cortex und des Striatums. Vielmehr wurde hier ein Defizit im Glutathion-Redox-System im frontalen Cortex nachgewiesen, das nicht mit einem veränderten Dopaminumsatz oder einer erhöhten Superoxid-Dismutase-Aktivität einhergeht (Güldenpfennig et al., 2011).

Im Rahmen dieses Promotionsprojektes wurden die Serotonin- und Dopamingehalte aus Gesamt-Gehirn-Lysaten mittels LC-MS/MS bestimmt. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen stereotypen und nicht-stereotypen FVB/NJ-Mäusen, wobei die Dopaminwerte bei stereotypen Tieren leicht, wenn auch nicht signifikant, erhöht waren. Beachtet man den Aspekt, dass SRT an der Regulation der circadianen Rhythmik beteiligt ist, und wir keinen Unterschied im tageszeitabhängigen Aktivitätsmuster der Mäuse sehen, wären diesbezüglich auch keine SRT-Unterschiede zu erwarten. SRT reguliert allerdings

darüber hinaus diverse kognitive und emotionale Verhaltensweisen und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Stimmung, Angst- und Aggressionsverhalten. Vorrangig für die Leidens-assoziierte Beurteilung von Stereotypen ist von Bedeutung, dass SRT Emotionen beeinflusst und SRT-Imbalancen zu Depressionen führen können. Demzufolge ist eine gehirnarealspezifische Analyse erstrebenswert. In der vorangegangenen Studie (siehe oben, gleiches Kapitel) wurden die SRT-Gehalte lediglich im Striatum bestimmt. Allerdings spielt SRT als zentraler Neurotransmitter vor allem in den Raphe-Kernen und dem Hypothalamus eine übergeordnete Rolle, deshalb sollten diese Regionen Gegenstand zukünftiger Analysen sein. Beim dopaminergen System sind zwei Neuronengruppen von besonderer Relevanz. Eine Neuronengruppe entspringt der Substantia nigra und projiziert zum Striatum. Diese Neuronengruppe ist vor allem für die Steuerung willkürlicher Motorfunktion verantwortlich. Zwar zeigen stereotype Tiere insgesamt eine erhöhte Aktivität und die stereotypen Verhaltensmuster erscheinen in ihrer Ausführung sehr komplex, allerdings kommt es im Laufe der Emanzipation stereotypen Verhaltens auch zu einer Beschränkung des Verhaltensrepertoires, sodass diverse Verhaltensweisen nicht mehr oder nur noch limitiert gezeigt werden. Sodass es plausibel ist, dass in den vorangegangenen Studien, in denen DA (und dessen Metaboliten) im frontalen Cortex und im Striatum bestimmt wurden, keine Unterschiede detektieren konnten. Allerdings stellte sich in den Daten der vorliegenden Arbeit eine Tendenz zu erhöhten DA-Gehalten der Gesamt-Gehirn-Lysate der stereotypen Tiere heraus. Eine Begründung könnte man eventuell in der zweiten Neuronengruppe finden. Nervenzellen dieser Gruppe entspringen am ventralen Tegmentum und projizieren u.a. zum Nucleus accumbens und der Amygdala. Diese Neuronengruppe stellt das mesokortikolimbische System dar, das maßgebliche Bedeutung für die Motivation hat und gleichzeitig als „positives Belohnungssystem“ entscheidend an der Entstehung der Emotion „Freude“ beteiligt ist. Gerade vor dem Hintergrund der Debatte inwiefern Stereotypen als Indikatoren für Leiden und beeinträchtigtes Wohlbefinden dienen, sollten sich zukünftige Studien auf Analysen bezüglich der Dopaminkonzentrationen und Dopaminrezeptorexpression in spezifischen Arealen des mesokortikolimbischen Systems fokussieren.

Zur objektiven Beurteilung des Einflusses stereotypen Verhaltens auf das Wohlergehen des Tieres sind keine einzelnen Indizes hinweisgebend. Vielmehr sollten sie immer in Abhängigkeit von der betroffenen Spezies, dessen Geschlecht, den vorherrschenden Haltungsbedingungen und der Form und dem Level der Stereotypie betrachtet werden (Mason and Latham, 2004).

Des Weiteren spielt auch die Persönlichkeit des Tieres (*Animal Personality*) bei der Entwicklung und der Beurteilung stereotypen Verhaltens eine Rolle (Ijichi et al., 2013). *Animal Personality* wird definiert als individuelle Verhaltensunterschiede, die über verschiedene Kontexte und Zeiten hinweg konstant bleiben (Gosling, 2008) (Kapitel 2.12).

Dies bedeutet, dass Tiere aufgrund ihrer physiologischen Konstitution unterschiedlich auf suboptimale Bedingungen reagieren (Koolhaas et al., 1999). Es ist davon abhängig, wie stressanfällig die Tiere *per se* sind und wie sie versuchen Stress zu minimieren, wenn eine kritische Grenze bereits erreicht wurde (Koolhaas et al., 2010). Proaktive Tiere zeichnen sich durch aktive Stressreaktionen aus, wie z.B. aktives Schwimmen im forcierten Schwimm-Test (Veenema et al., 2005) und geringe Immobilität (Benus et al., 1987). Die eher reaktiven Individuen reagieren in stressigen Situationen vorwiegend mit der *freeze-response* (dem „Einfrieren“). Proaktive Tiere versuchen Kontrolle über Stressoren zu behalten und erreichen dies durch Aggression, Entfernung des Stressors oder, falls diese Möglichkeiten fehlschlagen, indem sie sich selbst aus dem Kontext, in dem der Stressor anwesend ist, entfernen. Reaktive Tiere wiederum wenden eher passive Reaktionen auf den Stressor an und zeigen, wenn überhaupt, lediglich Versuche ihn zu kontrollieren (Porsolt et al., 1977). Proaktive Individuen haben viele Gemeinsamkeiten mit stereotypen Tieren bezüglich diverser physiologischer und verhaltensorientierter Merkmale, die darauf hindeuten, dass es hier einen Zusammenhang gibt. Die Verhaltensmuster proaktiver Tiere werden z.B. häufig unabhängig von der aktuellen Situation gezeigt und in Routinen ausgeführt (Bolhuis et al., 2004), ähnlich der Entwicklungsstufen und der Emanzipation stereotypen Verhaltens. Außerdem können bei proaktiven Individuen hohe Dopamingehalte nachgewiesen werden (Lecca et al., 2004; Nelson and Killcross, 2006), ein zentraler Neurotransmitter in der Ontogenese stereotypen Verhaltens. Im Gegensatz zu Dopamin, ist Serotonin negativ mit der Proaktivität korreliert. Proaktive Tiere reagieren mit einer rapiden Zunahme des Frustrationsverhaltens, wenn eine positive Verstärkung ausbleibt (David et al., 2004). Da Frustration potentiell einen grundlegenden Faktor für die Entstehung stereotypen Verhaltens darstellt, sind proaktive Tiere mit einer geringen Frustrationstoleranz vermutlich prädisponiert für die Entwicklung von Stereotypen. In stressigen Situationen zeigen proaktive Tiere klare Verhaltensreaktionen, während sie versuchen, den Stressor unter Kontrolle zu bringen. Sie reagieren aber weniger mit einer Antwort der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (HPA). Reaktive Tiere hingegen verhalten sich unter stressigen Konditionen eher passiv, was dazu verleitet, dieses Verhalten als eine geringe Stressreaktion zu interpretieren. Sie zeigen allerdings eine deutliche Aktivierung der HPA (Ruis et al., 2000). Gibt es tatsächlich einen Zusammenhang von proaktiven Persönlichkeiten zu stereotypen Individuen und umgekehrt, könnten nicht-stereotype Tiere durch suboptimale Umweltbedingungen und das damit verbundene beeinträchtigte Wohlbefinden mehr gestresst sein als stereotype Tiere. Somit könnte, aufgrund der ausbleibenden Verhaltensreaktionen, chronischer Stress bei reaktiven (=nicht-stereotypen) Individuen nur erschwert identifiziert werden und sie eventuell diejenigen sein, die mehr unter den aktuellen Gegebenheiten leiden (Ijichi et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unabhängig davon, ob Stereotypen aufgrund zurückliegender oder aktueller Einschränkungen ausgelöst wurden, die Haltungssysteme, die zu stereotypem Verhalten führen, tatsächlich suboptimal gestaltet sind und das Ausüben speziesspezifisches Verhalten limitieren, bzw. eine Adaptation erfordern. Während der Haltung von Labornagern weicht die Haltungsumgebung oftmals von evolutionär geprägten Umwelterwartungen ab. Dies führt zu einer Diskrepanz zwischen der inhärenten Anpassungsfähigkeit einer Spezies und den Anforderungen, die eine anthropogene Umgebung an sie stellt (Düpjan and Puppe, 2016). Fortschrittliche Technologien der Haltungssysteme, wie IVC, ermöglichen einerseits ein optimiertes Hygienemanagement und einen hohen Standardisierungsgrad, andererseits beeinflussen sie den Verhaltensphänotyp durch die Modulation von kognitivem und angstassoziiertem Verhalten (Kallnik et al., 2007; Mineur and Crusio, 2009) und erhöhen z.B. Schreckreaktionen (Logge et al., 2013). Darüber hinaus ist im IVC die vokale, pheromonale und olfaktorische Kommunikation begrenzt, was zu fortschreitenden Limitierungen der visuellen, olfaktorischen und auditiven Fähigkeiten führt (Baumans et al., 2002). Die Haltung im IVC stellt somit eine Form der Isolationshaltung dar, da die Möglichkeiten des interindividuellen Austauschs olfaktorischer und akustischer Signale beschränkt sind (Hawkins et al., 2003). Die heutigen Inzucht-Labormäuse unterscheiden sich zudem von Wildmäusen in der Hinsicht, dass die Geruchskapazitäten inzuchtbedingt modifiziert wurden und demnach die Differenzierung in „selbst“ und „fremd“ limitiert ist (Nevison et al., 2000). Des Weiteren führt ein Mangel an olfaktorischer Stimulation in frühen Lebensphasen zu einer reduzierten olfaktorischen Leistung im späteren Leben und beeinflusst damit das Verhalten und die Anpassungsfähigkeit des Tieres (François et al., 2013; He et al., 2012.; Scott et al., 2017). Das Wohlbefinden eines Individuums ist allerdings nur dann sichergestellt, wenn eine adäquate Reaktion auf Umweltveränderungen erfolgen kann (Fraser et al., 1997.; Morgan et al., 2007). Ist ein Tier über einen längeren Zeitraum unfähig, seine Umwelt zu manipulieren und hoch motiviertes natürliches Verhalten auszuleben, führt dies zu Distress und darüber hinaus zu abnormalen Verhaltensweisen, wie Stereotypen (Mason, 1991).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings keine Hinweise dafür gefunden werden, dass Tiere, die unter diesen Umständen Stereotypen entwickeln mehr oder weniger unter den gegebenen Haltungsbedingungen leiden als nicht-stereotype Tiere.

6.5 Auswirkungen stereotypen Verhaltens auf die Ergebnisse tierexperimenteller Studien

In vielen Artikeln über die Prinzipien der Labortierhaltung wird die sogenannte „*Environmental Standardization*“, also die standardisierte Gestaltung der Haltungsumwelt,

empfohlen. Die benannte Standardisierung soll auf der einen Seite die Variation innerhalb eines Experiments verringern, damit die Sensitivität erhöhen und so die Anzahl benötigter Tiere innerhalb der Studie reduzieren. Auf der anderen Seite soll die Standardisierung der Haltungsumgebung auch zu einer Senkung der Variation zwischen den Experimenten und somit zu einer gesteigerten Reproduzierbarkeit innerhalb und zwischen verschiedenen Laboren führen (Zutphen et al., 2001). Versuchsbedingungen über Labore hinweg zu standardisieren bedeutet in den meisten Fällen die Haltung der Tiere in einer reizarmen Umgebung. Wie bereits erwähnt, kann diese fehlende Strukturierung der Umwelt Verhaltensabweichungen, wie Stereotypen, auslösen. Zudem stellte sich heraus, dass „*Environmental Standardization*“ eher die Ursache, als das Heilmittel einer schlechten Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen ist. Zudem kann die Standardisierung zu verfälschten Resultaten und der unnötigen Verwendung von Tieren führen. Demzufolge spiegeln Experimente, die unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden lediglich eine „lokale Wahrheit“ mit geringer externer Validität wider (Richter et al., 2009). Durch die Verwendung von Tieren, die abnormale Verhaltensweisen zeigen, wird die Validität (=Gültigkeit, Aussagekraft) tierexperimenteller Studien maßgeblich eingeschränkt. Außerdem sinken, aufgrund der gesteigerten interindividuellen Variation, die Reliabilität (=Zuverlässigkeit, Verbindlichkeit) und die Reproduzierbarkeit (=Nachvollziehbarkeit) tierexperimenteller Untersuchungen (Garner, 2005). Darüber hinaus beeinflussen insbesondere die Form und das Level der ausgeführten Stereotypie die Ergebnisse von Wahlversuchen und Untersuchungen zum explorativen Verhalten und tragen somit zu der Variabilität und verminderten Reproduzierbarkeit bei (Novak et al., 2015).

Die Ergebnisse dieses Projektes bestätigen diese Ausführungen. Die FVB/NJ-Mäuse der vorliegenden Studie wurden unter standardisierten Haltungsbedingungen gehalten, welche zu einer 54%igen Prävalenz stereotypen Verhaltens in der F₁-Generation führten. Abgesehen von diversen Verhaltensaspekten (Verhaltensrepertoire, Verhalten im Open Field), unterschieden sich nicht-stereotype Tiere in erheblicher Weise von stereotypen Tieren hinsichtlich der körperlichen Fitness (zurückgelegte Distanzen, Körpergewichtsentwicklung, Körperzusammensetzung), der damit assoziierten Parameter (z.B. Glykogengehalt des *M. quadriceps*) und in Bezug auf die relativen Organgewichte. Nicht-stereotype und stereotype Tiere innerhalb einer Studie zu randomisieren würde im weiteren Sinne bedeuten, eine Maus des proaktiven Typs mit einer eher trägen Maus gleichzusetzen und hätte entscheidenden Einfluss auf die Versuchsergebnisse und die anschließende Interpretation der Resultate. Anstatt Tiere vom Experiment zu exkludieren, die im Verlaufe eines Projektes stereotypes Verhalten entwickeln, sollte das erklärte Ziel sein, Stereotypen zu verhindern. Die artgerechte und adäquate Käfiganreicherung

(„*Environmental Enrichment*“) erweist sich scheinbar als effektivste Methode, um stereotypem Verhalten entgegenzuwirken (siehe Kapitel 2.11).

Mehrere wissenschaftliche Arbeiten stellten heraus, dass eine Käfiganreicherung der gewünschten Standardisierung von Experimenten nicht entgegenwirkt. *Environmental Enrichment* steigert laut WÜRBEL das Wohlbefinden von Tieren, ohne die Reliabilität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu reduzieren, während es außerdem zentrale Dysfunktionen und ängstliches Verhalten abschwächt (Würbel, 2007). Im Umkehrschluss steigern also komplexe Haltungssysteme, die zu einer Reduzierung von Stereotypen beitragen, sogar die Aussagekraft und Wiederholbarkeit von Daten zum Verhalten von Labornagern (Garner and Mason, 2002). Studien stellten heraus, dass eine angereicherte Gestaltung der Käfigumgebung keinesfalls die individuelle Variabilität erhöht und zudem zu keinem erhöhten Risiko, bei der Wiederholung von Versuchen divergierende Ergebnisse zu erlangen, führt (Wolfer et al., 2004). Aus einer Studie ergab sich darüber hinaus die Feststellung, dass die Reliabilität von Untersuchungen zum Angst- und Explorationsverhalten auch durch wechselnde Experimentatoren und Laborbedingungen nicht ernsthaft eingeschränkt wird (Lewejohann et al., 2006). Hierbei bleibt allerdings offen, welchen Einfluss das Geschlecht des Experimentators auf die Ergebnisse hat. Die systematische Randomisierung der Haltungsbedingungen bewirkt laut WÜRBEL und GARNER eine gesteigerte externe Validität (und somit Reproduzierbarkeit) der Versuchsergebnisse ohne die Anzahl verwendeter Tiere zu maximieren (Würbel and Garner, 2007). Mäuse sollten demzufolge in einer strukturierten, komplexen, angereicherten Umwelt gehalten werden, um die Heterogenität der Versuchsbedingungen zu maximieren und so die Qualität der Forschungsergebnisse und das Wohlbefinden der Tiere zu steigern. Käfiganreicherung sollte demnach zukünftig eher ein „Muss“ als ein „Kann“ sein oder besser noch, den Goldstandard darstellen. Denn durch eine artspezifische und verhaltensgerechte Gestaltung der Haltungsumwelt und dem Angebot von kognitiver und/oder Umweltsanreicherung kann das Tier speziesspezifisches Normalverhalten entwickeln und ausleben und der Entstehung stereotypen Verhaltens entgegengewirkt werden (Düpjan and Puppe, 2016).

Abschlussbetrachtung

Ein zentrales Ziel des Refinements in der 3R-Forschung ist es, die Haltungsbedingungen von zu Versuchszwecken gehaltenen Tieren zu verbessern, um Unbehagen und damit verbundene Verhaltens- und/oder körperliche Beeinträchtigungen zu vermeiden. Unklar ist jedoch, welchen Stellenwert umweltbedingte Verhaltensabweichungen, wie Stereotypen, hierbei einnehmen. Zudem fehlen konkrete Daten z.B. zur Verwendung stereotyper Tiere in Studien mit tierexperimentellem Schwerpunkt oder zur Belastungseinschätzung von

Mausstämmen, die zu einer vergleichsweise hohen Prävalenz stereotypen Verhaltens neigen. Bevor jedoch tatsächliche Empfehlungen erlassen werden können, sind profunde Grundlagen erforderlich, die das Verständnis von derartigen Verhaltensabweichungen erweitern. Diese Arbeit trug stark zu diesem Aspekt bei und zeigte deutlich, dass Stereotypien in FVB/NJ-Mäusen hinsichtlich ihres Fortbewegungsmusters variieren, offensichtlich nicht direkt genetisch oder verhaltensassoziiert übertragen werden und einen signifikanten Einfluss auf diverse metabolische Parameter haben. Die beobachteten Effekte scheinen unabhängig von standardisierten Haltungsbedingungen zu sein. Dieser Aspekt deutet darauf hin, dass individuelle Eigenschaften und Variablen im Sinne der *Animal Personality* viel stärker berücksichtigt werden müssen.

7 Zusammenfassung

Im Sinne des Refinements von Tierversuchen sollen alle Bedingungen während der Zucht, der Haltung und des Transports von zu Versuchszwecken gehaltenen Tieren und alle Methoden während des Versuchs so verbessert werden, dass die verwendeten Tiere ein minimales Maß an potentiellm Distress, Schmerzen oder Leiden erfahren. Zudem soll ihr Wohlbefinden durch die Möglichkeit des Auslebens speziesspezifischer Verhaltensweisen und die Anwendung tierschonender Verfahren maximal gefördert werden. Zur Etablierung von Grundsätzen des Refinements sind grundlegende Kenntnisse über die physiologischen Bedürfnisse und Verhaltensansprüche der jeweiligen Spezies unabdingbar. Die Experimentatoren sollten das Normalverhalten der Tiere kennen, um potentielle Verhaltensabweichungen, wie Stereotypien, zu verstehen und interpretieren zu können. Standardisierte Haltungsbedingungen von zu Versuchszwecken gehaltenen Mäusen weichen in diversen Aspekten von der natürlichen Umgebung ab und erfordern eine gewisse Adaptation. Eine Verhaltensanpassung ermöglicht einem Tier, sich optimal an sich ändernde Umweltbedingungen anzupassen und formt darüber hinaus das speziesspezifische Verhaltensrepertoire. Ist ein Tier über einen längeren Zeitraum unfähig, sich an die gegebenen Umstände anzupassen, können abnormale Verhaltensweisen, wie Stereotypien auftreten. Stereotypien werden definiert als Abweichungen vom Normalverhalten, die repetitiv und ohne Abweichungen im Ablauf ausgeführt werden, scheinbar keiner Funktion dienen und der konkreten Umweltsituation nicht immer entsprechen.

Bisher war unklar, in welchem Ausmaß stereotypes Verhalten den metabolischen Phänotyp eines Individuums beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war es daher, das stereotype Verhalten der FVB/NJ-Maus, exemplarisch für stereotype Mauslinien, erstmals detailliert zu charakterisieren, systematisch zusammenzutragen, welche metabolischen Konsequenzen dieses Verhalten bedingt und wie sich diese auf das Wohlbefinden der Tiere und die Verwendung stereotyper Tiere in Studien mit tierexperimentellem Schwerpunkt auswirken. Um bereits frühe Einflussfaktoren auf die spätere Entwicklung stereotypen Verhaltens in der ersten Tochtergeneration (F₁-Generation) zu erfassen, begann der Versuch mit der Charakterisierung der mütterlichen Fürsorge (*maternal care*) in der Parentalgeneration. Insgesamt wurden 35 Jungtiere der F₁-Generation vom Absatz an, über einen Zeitraum von 11 Wochen einzeln gehalten, kontinuierlich beobachtet, bis zum Versuchsende wöchentlich Kotproben gesammelt und das Körpergewicht bestimmt. Zusätzlich erfolgten begleitende Untersuchungen wie Verhaltenstests und die Erfassung der physischen Aktivität und metabolischer Parameter. Anschließend wurden u.a. die zerebralen Serotonin- und Dopamingehalte, fäkale Glucocorticoidlevels, hepatisches Glykogen und muskuläre Glykogen- und Triglyceridlevels bestimmt.

Hinsichtlich der mütterlichen Fürsorge ergaben sich keine Unterschiede zwischen stereotypen und nicht-stereotypen Muttertieren. Nahezu unabhängig von der mütterlichen Herkunft entwickelte sich bei mehr als der Hälfte der 35 Jungtiere in der F₁-Generation stereotypes Verhalten. Diese Daten deuten darauf hin, dass es keine Anzeichen für das Erlernen oder eine direkte genetische Transmission stereotypen Verhaltens bei der FVB/NJ-Maus gibt. Der überwiegende Anteil der stereotypen Jungtiere wies die Stereotypie des *back flipping* (Springen von Rückwärtssaltos) auf, einige Tiere zeigten das stereotype *circuit running* (kreisförmiges Ablaufen des Käfigbodens) und *wire gnawing* (vehementes Benagen des Käfiggitters). Über den gesamten Beobachtungszeitraum zeichneten sich die stereotypen FVB/NJ-Mäuse durch ein eingeschränktes Verhaltensrepertoire aus. Zu Gunsten der erhöhten Aktivität und des Ausübens stereotypen Verhaltens lebten sie insgesamt weniger andere Verhaltensweisen (Klettern, Graben, Nagen) aus. Darüber hinaus waren Stereotypen sowohl im 24-Stunden Open Field Test als auch in der Messeinrichtung der indirekten Tierkalorimetrie mit einer erhöhten Aktivität und Motilität assoziiert, während die circadiane Rhythmik nicht divergierte. Diese erhöhte körperliche Betätigung spiegelte sich in den zu erwartenden geschlechterabhängig niedrigeren Körpergewichtsentwicklungen der stereotypen Tiere wieder. Außerdem unterschieden sich die Körperfett- und Körpermuskelanteile. Stereotype FVB/NJ-Mäuse setzten sich in Versuchswoche 7 und 12 aus mehr relativer Muskelmasse und weniger Fettmasse zusammen, verglichen mit nicht-stereotypen FVB/NJ-Mäusen. Es stellten sich zudem signifikante Unterschiede hinsichtlich der Organgewichte heraus. Das relative Gewicht des braunen Fettgewebes verhielt sich ähnlich zwischen den Versuchsgruppen, jedoch wiesen die stereotypen Mäuse erhöhte relative Herz-, Milz-, Gehirn- und Lebergewichte auf. Darüber hinaus konnten, mit den im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten zu fäkalen Cortisol- und Corticosterongehalten sowie den Neurotransmittern Serotonin und Dopamin, keine Hinweise für eine stressabhängige Regulation der Stereotypen bei der FVB/NJ-Maus gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Ausüben stereotypen Verhaltens zu Differenzen im metabolischen Phänotyp nicht-stereotyper und stereotyper FVB/NJ-Mäuse führt. Im Sinne der „Guten Wissenschaftlichen Praxis“ („Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis,“ 2013) sollte das zentrale Ziel jedes Wissenschaftlers sein, aussagekräftige und reproduzierbare Daten hervorzubringen. Jedoch können keine validen Resultate von Tieren erzeugt werden, die in Aspekten variieren, die für den vorgesehenen Zweck der Studie nicht berücksichtigt wurden. Deshalb sollten nicht-stereotype und stereotype Individuen nicht innerhalb einer Versuchsgruppe randomisiert werden. Stereotype Tiere demzufolge konsequent von geplanten Studien auszuschließen, würde allerdings dem Gebot des zweiten R's – der Reduction – widersprechen. Um Refinement zu garantieren, sollte der Fokus auf der maximal erreichbaren Prävention stereotypen Verhaltens liegen. Diverse Studien haben bereits gezeigt, dass die Anreicherung der Haltungsumwelt (*environmental*

enrichment) zu einer Senkung der Prävalenz von Stereotypen bei Mäusen führt (Cooper et al., 1996b; A. N.-M. Gross et al., 2011; Gross et al., 2012; Megan Anne Jones et al., 2011; Leach et al., 2000; Mason et al., 2007; Olsson and Dahlborn, 2002; Powell et al., 1999; Tilly et al., 2010), dennoch kommen sie weiterhin vor. Daher sollte *environmental enrichment* zukünftig weniger ein „Kann“, sondern ein „Muss“ sein – oder vielmehr: der Goldstandard. In Anbetracht der Tatsache, dass das Ausüben stereotypen Verhaltens mit dem zirkadianen Rhythmus der Gesamtaktivität einhergeht und die höchsten Niveaus zu Zeiten erreicht werden, in denen sich normalerweise weder Tierpfleger noch Experimentator in der Tierhaltung befinden, werden Stereotypen nicht immer zuverlässig bemerkt. Daher würde eine profunde phänotypische Charakterisierung dazu beitragen, Mausstämme zu erkennen, die zu Stereotypen neigen und den für den spezifischen Zweck am besten geeigneten Mausstamm zu identifizieren, bevor ein Experiment geplant wird. Somit führt eine detaillierte Charakterisierung im Sinne des Refinements wiederum zum Erreichen der gewünschten Reductionstandards.

8 Summary

In the sense of refinement animal experimentation, all conditions during breeding, husbandry and transport of animals used for experimental purposes and all methods during the experiment should be improved to reduce the degree of potential distress, pain or suffering. In addition, their well-being should be guaranteed by the possibility of expressing natural and species-specific behavioural patterns and by the application of considerate procedures. In order to establish principles for refinement, basic knowledge about the physiological needs and behavioural requirements of the respective species is indispensable. The experimenters should know the normal behaviour of animals in order to understand and interpret potential behavioural deviations, such as stereotypies. Standardized housing conditions of laboratory mice deviate from the natural environment in various aspects and might require a certain adaptation. Behavioural adaptation allows animals to adjust to environmental changes and leads to species' characteristic behaviour. If an animal is unable to adapt to environmental conditions, abnormal behaviours like stereotypies might occur. Stereotypies are defined as deviations from normal behaviour, which are executed repetitively and without deviations in the performance, seem to serve no function and do not always correspond to the concrete environmental situation.

Since it remains unclear to what extent stereotypic behaviour influences the individual's metabolic phenotype, this study investigated behaviour of FVB/NJ mice in detail, exemplarily for stereotypy-prone mouse strains, and compiled the impact of behavioural deviations on physical activity, animal metabolism, animal welfare and on results obtained from studies with an animal specific focus.

To detect early indicators for the later development of stereotypic behaviour in the F₁ generation, this study started with investigating maternal care in the parental generation. Overall, 35 animals of the F₁ generation were kept individually from weaning age. For 11 weeks they were observed, faecal samples were obtained and body weight was determined. Additionally, behavioural tests, metabolic parameters and physical activity were investigated. Furthermore, among others, cerebral serotonin and dopamine contents, faecal glucocorticoid levels and hepatic glycogen, muscular triglyceride and glycogen levels were assessed.

Regarding maternal care there were no differences between stereotypic and non-stereotypic mothers. Almost independently of the mother's origin, more than half of the 35 pups developed stereotypic behavior in the F₁ generation. Data suggest that there is obviously no evidence of learning or a direct genetic transmission of stereotypic behavior in the FVB/NJ-mouse. The predominant portion of stereotypic animals performed the stereotypy of back-flipping (backwards jumping), some animals demonstrated stereotypic circuit running (running in circles on the cage bottom) and wire gnawing (persistent gnawing on the cage grid while hanging with the forelimbs on it). Because of the increased

activity and the performance of stereotypic behaviour, stereotypic mice displayed a restricted behavioural repertoire (reduced climbing, digging, gnawing). Moreover, stereotypies were associated with increased activity and motility, both in the 24-hours open field test and in the ITK system, while the circadian rhythm did not diverge. This elevated physical activity was reflected in the expected gender-dependent lower body weight development of stereotypic animals. In addition, stereotypic FVB/NJ-mice contained more relative muscle mass and less fat mass compared to non-stereotypic FVB/NJ-mice in experimental weeks 7 and 12. Significant differences in the organ weights were found. The relative weight of the brown adipose tissue was comparable between the experimental groups, but stereotypic mice had elevated relative heart, spleen, brain and liver weights. Additionally, generated data on faecal cortisol and corticosterone levels and on the neurotransmitters serotonin and dopamine revealed no evidence for a stress-dependent regulation of stereotypies in the FVB /NJ-mouse.

In conclusion, the performance of stereotypic behaviour leads to differences in the metabolic phenotype between non-stereotypic and stereotypic FVB/NJ mice. In the sense of "Good Scientific Practice" ("Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis," 2013), the central aim of any scientist should be to generate meaningful and reproducible data. However, no valid results can be generated with data derived from animals which differ in aspects that were not considered for the designated purpose of the study. Therefore, stereotypic and non-stereotypic individuals should not be randomized within one trial group. To generally exclude stereotypic animals consequently from further studies, though, would interfere with the commandment of the second "R" - the reduction. To guarantee a maximum refinement, the focus should be the highest achievable prevention of stereotypies. Multiple studies indicate that environmental enrichment decreases the prevalence of stereotypic behaviour in mice (Cooper et al., 1996b; A. N.-M. Gross et al., 2011; Gross et al., 2012; Megan Anne Jones et al., 2011; Leach et al., 2000; Mason et al., 2007; Olsson and Dahlborn, 2002; Powell et al., 1999; Tilly et al., 2010), nevertheless they still occur. Thus, environmental enrichment of animal housing should not be a "can" but a "must", or rather the "golden standard". Considering that the performance of stereotypic behaviour is associated with the circadian rhythm of overall activity and reaches the highest levels at times when usually no caretaker or experimenter is in the animal facility, stereotypies may fail to be noticed. Hence, a profound phenotypic characterization would help to identify a stereotypy-prone mouse strain and to determine the mouse strain most suitable for the specific purpose before planning an experiment. Besides the contribution to refinement, this profound characterization would support the desired reduction standards.

A Literaturverzeichnis

- Baker, N., Stolba, A., Wood-Gush, D.G.M., 1983. The Characterisation of Stereotyped Behaviour in Stalled Sows By Informational Redundancy. *Behaviour* 87, 157–182. doi:10.1163/156853983X00417
- Barboza, C.A.G., Pinto, L.P., Freitas, R. de A., Costa, A. de L.L., Souza, L.B. de, 2005. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 protein expression in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. *Braz. Dent. J.* 16, 56–61. doi:10.1590/S0103-64402005000100010
- Barwick, V.S., Jones, D.H., Richter, J.T., Hicks, P.B., Young, K.A., 2000. Subthalamic nucleus microinjections of 5-HT₂ receptor antagonists suppress stereotypy in rats. *Neuroreport* 11, 267–70.
- Baumans, V., Schlingmann, F., Vonck, M., Lith, H.A. Van, 2002. Individually Ventilated Cages: Beneficial for Mice and Men? *Contemp Top Lab Anim Sci.* 41(1):13-9.
- Bechard, A., Nicholson, A., Mason, G., 2012. Litter size predicts adult stereotypic behavior in female laboratory mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*
- Belzung, C., Griebel, G., 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav. Brain Res.* 125, 141–149. doi:10.1016/S0166-4328(01)00291-1
- Benus, R.F., Koolhaas, J.M., Van Oortmersen, G.A., 1987. Individual Differences in Behavioural Reaction To a Changing Environment in Mice and Rats. *Behaviour* 100, 105–121. doi:10.1163/156853987X00099
- Biddle, F.G., Eales, B.A., 1996. The degree of lateralization of paw usage (handedness) in the mouse is defined by three major phenotypes. *Behav. Genet.* 26, 391–406.
- Biro, P.A., Stamps, J.A., Sih, A., Al., E., Reale, D., Al., E., Carere, C., Al., E., 2008. Are animal personality traits linked to life-history productivity? *Trends Ecol. Evol.* 23, 361–8. doi:10.1016/j.tree.2008.04.003
- Bolhuis, J.E., Schouten, W.G.P., de Leeuw, J.A., Schrama, J.W., Wiegant, V.M., 2004. Individual coping characteristics, rearing conditions and behavioural flexibility in pigs. *Behav. Brain Res.* 152, 351–60. doi:10.1016/j.bbr.2003.10.024
- Bredenbröcker, D., 2013. Studie zum stereotypen Laufen bei Hauspferden. Dissertation.
- Broom, D.M., 1991. Animal Welfare: Concepts and measurements. *J Anim Sci.* 69(10):4167-75.
- Broom, D.M., 1986. Indicators of poor welfare. *Br. Vet. J.* 142, 524–526. doi:10.1016/0007-1935(86)90109-0
- Burgomaster, K.A., Howarth, K.R., Phillips, S.M., Rakobowchuk, M., MacDonald, M.J., McGee, S.L., Gibala, M.J., 2008. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J. Physiol.* 586, 151–160. doi:10.1113/jphysiol.2007.142109

- Burke, R.E., 1967. Motor unit types of cat triceps surae muscle. *J. Physiol.* 193, 141–60.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Salzman, M., Tsairis, P., 1974. Motor units in cat soleus muscle: physiological, histochemical and morphological characteristics. *J. Physiol.* 238, 503–14.
- Burman, O., Buccarello, L., Redaelli, V., Cervo, L., 2014. The effect of two different Individually Ventilated Cage systems on anxiety-related behaviour and welfare in two strains of laboratory mouse. *Physiol. Behav.* 124, 92–99. doi:10.1016/j.physbeh.2013.10.019
- Busch, M., Chourbaji, H.S., Dammann, H.P., Gerold, E.S., Haemisch, T.A., Jirkof, H.P., Oehlert, Z.P., Osterkamp, E.A., Ott, S.S., Peters, U.S., Spekl, G.K., Tsai, D.P., Gastautor, H., Langen, B., 2014. Tiergerechte Haltung von Labormäusen Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung.
- Cabib, S., Bonaventura, N., 1997. Parallel strain-dependent susceptibility to environmentally-induced stereotypies and stress-induced behavioral sensitization in mice. *Physiol. Behav.* 61, 499–506.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.95.9.5335
- Canal, C.E., Felsing, D.E., Liu, Y., Zhu, W., Wood, J.T., Perry, C.K., Vemula, R., Booth, R.G., 2015. An Orally Active Phenylaminotetralin-Chemotype Serotonin 5-HT₇ and 5-HT_{1A} Receptor Partial Agonist That Corrects Motor Stereotypy in Mouse Models. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 1259–1270. doi:10.1021/acschemneuro.5b00099
- Cash-Padgett, T., Sawa, A., Jaaro-Peled, H., 2016. Increased stereotypy in conditional *Cxcr4* knockout mice, *Neuroscience Research*. doi:10.1016/j.neures.2015.10.001
- Champagne, F.A., Francis, D.D., Mar, A., Meaney, M.J., 2003. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development, in: *Physiology and Behavior*. pp. 359–371. doi:10.1016/S0031-9384(03)00149-5
- Cooper, S.J., Dourish, C.T., 1990. *Neurobiology of stereotyped behaviour*. Clarendon Press: Oxford.
- Cooper, J.J., Ödberg, F., Nicol, C.J., 1996a. Limitations on the effectiveness of environmental improvement in reducing stereotypic behaviour in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 48, 237–248. doi:10.1016/0168-1591(95)01020-3
- Cooper, J.J., Ödberg, F., Nicol, C.J., 1996b. Limitations on the effectiveness of environmental improvement in reducing stereotypic behaviour in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 48, 237–248. doi:10.1016/0168-1591(95)01020-3
- Daigle, C.L., Rodenburg, T.B., Bolhuis, J.E., Swanson, J.C., Siegford, J.M., 2014. Use of

- dynamic and rewarding environmental enrichment to alleviate feather pecking in non-cage laying hens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 161. doi:10.1016/j.applanim.2014.10.001
- Dantzer, R., 1991. Stress, stereotypies and welfare. *Behav. Processes* 25, 95–102. doi:10.1016/0376-6357(91)90012-0
- David, J.T., Cervantes, M.C., Trosky, K.A., Salinas, J.A., Delville, Y., 2004. A neural network underlying individual differences in emotion and aggression in male golden hamsters. *Neuroscience* 126, 567–578. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.04.031
- Dawkins, M.S., 2008. The Science of Animal Suffering. *Ethology* 114, 937–945. doi:10.1111/j.1439-0310.2008.01557.x
- Dietrich, D.R., 1993. Toxicological and Pathological Applications of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), A Novel Endogenous Marker for Cell Proliferation. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 77–109. doi:10.3109/10408449309104075
- Düpjan, S., Puppe, B., 2016. Abnormales Verhalten mit dem Schwerpunkt Stereotypien – Indikator für Leiden und beeinträchtigtes Wohlbefinden? *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 129, 93–102. doi:10.2376/0005-9366-129-93
- Eban-Rothschild, A., Rothschild, G., Giardino, W.J., Jones, J.R., de Lecea, L., 2016. VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep–wake behaviors. *Nat. Neurosci.* 19, 1356–1366. doi:10.1038/nn.4377
- Engel, A.K.J., Gross, A.N., Richter, S.H., Rommen, J., Touma, C., Würbel, H., 2011. Variation in stress reactivity affects cage-induced stereotypies in female CD-1 (ICR) mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 133, 101–108. doi:10.1016/j.applanim.2011.04.017
- Fox, J., Barthold SW, Davisson, M., Newcomer, C., Quimby, F., Smith, A., 2007. *The Mouse in Biomedical Research: History, Wild Mice, and Genetics* - Google Books, 2nd ed.
- François, A., Laziz, I., Rimbaud, S., Grebert, D., Durieux, D., Pajot-Augy, E., Meunier, N., Costa, M.R., Montmayeur, J.-P., 2013. Early survival factor deprivation in the olfactory epithelium enhances activity-driven survival. doi:10.3389/fncel.2013.00271
- Fraser, A.F., Broom, D.M., 1997a. *Farm animal behaviour and welfare*. 3rd ed. Oxon (U.K.), CAB International. 437 p.
- Fraser, D., Weary, D.M., Pajor, E.A., Milligan, B.N., 1997b. A Scientific Conception of Animal Welfare that Reflects Ethical Concerns. *Anim. Welf.* 6 (3), , pp. 187-205(19).
- Fureix, C., Benhajali, H., Henry, S., Bruchet, A., Prunier, A., Ezzaouia, M., Coste, C., Hausberger, M., Palme, R., Jegou, P., 2013. Plasma cortisol and faecal cortisol metabolites concentrations in stereotypic and non-stereotypic horses: do stereotypic horses cope better with poor environmental conditions? *BMC Vet. Res.* 9, 3. doi:10.1186/1746-6148-9-3
- Fureix, C., Walker, M., Harper, L., Reynolds, K., Saldivia-Woo, A., Mason, G., 2016. Stereotypic behaviour in standard non-enriched cages is an alternative to depression-like responses in C57BL/6 mice, *Behavioural Brain Research*. doi:10.1016/j.bbr.2016.02.005

- G M Kubben, F.J., Peeters-Haesevoets, A., J B Engels, L.G., M I Baeten, C.G., Schutte, B., Arends, J.W., Stockbrugger, R.W., Blijham, G.H., M Kubben A Peeters-Haesevoets R W Stockbrugger, J.G., 1994. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut* 35, 530–535.
- Garner, J.P., Mason, G.J., 2002. Evidence for a relationship between cage stereotypies and behavioural disinhibition in laboratory rodents. *Behav. Brain Res.* doi:10.1016/S0166-4328(02)00111-0
- Garner, J.P., 2005. Stereotypies and Other Abnormal Repetitive Behaviors: Potential Impact on Validity, Reliability, and Replicability of Scientific Outcomes. *ILAR J.* 46, 106–117. doi:10.1093/ilar.46.2.106
- Gaskill, B.N., Gordon, C.J., Pajor, E.A., Lucas, J.R., Davis, J.K., Garner, J.P., 2012. Heat or Insulation: Behavioral Titration of Mouse Preference for Warmth or Access to a Nest. *PLoS One* 7, e32799. doi:10.1371/journal.pone.0032799
- Gaskill, B.N., Pritchett-Corning, K.R., 2015. The Effect of Cage Space on Behavior and Reproduction in Crl:CD1(Icr) and C57BL/6NCrl Laboratory Mice. *PLoS One* 10, e0127875. doi:10.1371/journal.pone.0127875
- Gielen, S., Schuler, G., Adams, V., 2010. Cardiovascular Effects of Exercise Training: Molecular Mechanisms. *Circulation.* 21;122(12):1221-38. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.939959.
- Girard, S.D., Escoffier, G., Khrestchatsky, M., Roman, F.S., 2016. The FVB/N mice: A well suited strain to study learning and memory processes using olfactory cues. *Behav. Brain Res.* 296, 254–9. doi:10.1016/j.bbr.2015.09.004
- Gosling, S.D., 2008. Personality in Non-human Animals. *Soc. Personal. Psychol. Compass* 2, 985–1001. doi:10.1111/j.1751-9004.2008.00087.x
- Gross, A.N.-M., Engel, A.K.J., Würbel, H., 2011. Simply a nest? Effects of different enrichments on stereotypic and anxiety-related behaviour in mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 134, 239–245. doi:10.1016/j.applanim.2011.06.020
- Gross, A.N., Engel, A.K.J., Richter, S.H., Garner, J.P., Würbel, H., 2011. Cage-induced stereotypies in female ICR CD-1 mice do not correlate with recurrent perseveration. *Behav. Brain Res.* 216, 613–620. doi:10.1016/j.bbr.2010.09.003
- Gross, A.N., Richter, S.H., Engel, A.K.J., Würbel, H., 2012. Cage-induced stereotypies, perseveration and the effects of environmental enrichment in laboratory mice. *Behav. Brain Res.* 234, 61–8. doi:10.1016/j.bbr.2012.06.007
- Güldenpfennig, M., Wolmarans, D.W., du Preez, J.L., Stein, D.J., Harvey, B.H., 2011. Cortico-striatal oxidative status, dopamine turnover and relation with stereotypy in the deer mouse. *Physiol. Behav.* 103, 404–411. doi:10.1016/j.physbeh.2011.03.008
- Gundersen, K., 2011. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 86, 564–600. doi:10.1111/j.1469-185X.2010.00161.x

-
- Harnack, E., 1874. Über die Wirkungen des Apomorphins am Säugetier und am Frosch ,Arch. Exp. Pathol Pharmacol, 2:254-306.
- Hawkins, P., Morton, D.B., Burman, O., Dennison, N., Honess, P., Jennings, M., Lane, S., Middleton, V., Roughan, J. V., Wells, S., Westwood, K., 2011. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. Lab. Anim. 45, 1–13. doi:10.1258/la.2010.010031
- Hawkins P, Anderson D, Applebee K., 2002. Individually ventilated cages and rodent welfare: Report of the 2002 RSPCA/UFAW rodent welfare group meeting. Anim. Technol. Welf. 2003;2:23–34.
- Hawley, J.A., Schabort, E.J., Noakes, T.D., Dennis, S.C., 1997. Carbohydrate-loading and exercise performance. An update. Sports Med. 24, 73–81.
- He, J., Tian, H., Lee, A.C., Ma, M., 2012. Postnatal Experience Modulates Functional Properties of Mouse Olfactory Sensory Neurons. Eur J Neurosci. 36(4): 2452–2460. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08170.x
- Heblinski, N., 2010. Ist die digitale, histologische Morphometrie zur Diagnostik der feline Kardiomyopathie geeignet? mbv, Mensch-und-Buch-Verl.
- Hediger, H., 1950. Wild animals in captivity. Butterworths Scientific Publications.
- Hedrich, H.J., Bullock, G.R., 2004. The laboratory mouse. Elsevier Academic Press.
- Herde, A., Eccard, J. a, 2013. Consistency in boldness, activity and exploration at different stages of life. BMC Ecol. doi:10.1186/1472-6785-13-49
- Hermansen, L., Hultman, E., Saltin, B., 1967. Muscle Glycogen during Prolonged Severe Exercise. Acta Physiol. Scand. 71, 129–139. doi:10.1111/j.1748-1716.1967.tb03719.x
- Hespel, P., Richter, E.A., 1990. Glucose uptake and transport in contracting, perfused rat muscle with different pre-contraction glycogen concentrations. J. Physiol. 427, 347–359. doi:10.1113/jphysiol.1990.sp018175
- Hewson, C.J., 2003. What is animal welfare? Common definitions and their practical consequences. Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can. 44, 496–9.
- Hickner, R.C., Fisher, J.S., Hansen, P.A., Racette, S.B., Mier, C.M., Turner, M.J., Holloszy, J.O., 1997. Muscle glycogen accumulation after endurance exercise in trained and untrained individuals. J. Appl. Physiol. 83, 897–903.
- Hoppeler, H., Howald, H., Conley, K., Lindstedt, S.L., Claassen, H., Vock, P., Weibel, E.R., 1985. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. J. Appl. Physiol. 59, 320–7.
- Hugo, C., Seier, J., Mdhluli, C., Daniels, W., Harvey, B.H., Du Toit, D., Wolfe-Coote, S., Nel, D., Stein, D.J., 2003. Fluoxetine decreases stereotypic behavior in primates. Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry 27, 639–643. doi:10.1016/S0278-5846(03)00073-3
-

- Ijichi, C.L., Collins, L.M., Elwood, R.W., 2013. Evidence for the role of personality in stereotypy predisposition. *Anim. Behav.* 85, 1145–1151. doi:10.1016/j.anbehav.2013.03.033
- Jensen, J., Rustad, P.I., Kolnes, A.J., Lai, Y.-C., 2011. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. *Front. Physiol.* 2, 112. doi:10.3389/fphys.2011.00112
- Jones, M., van Lierop, M., Pillay, N., Bateson, P., Boonstra, R., Hochachka, W., , 2008. All a mother's fault? Transmission of stereotypy in striped mice *Rhabdomys*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 115, 82–89. doi:10.1016/j.applanim.2008.05.007
- Jones, M.A., Mason, G., Pillay, N., 2010a. Early social experience influences the development of stereotypic behaviour in captive-born striped mice *Rhabdomys*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 123, 70–75. doi:10.1016/j.applanim.2009.12.009
- Jones, M.A., van Lierop, M., Mason, G., Pillay, N., 2010b. Increased reproductive output in stereotypic captive *Rhabdomys* females: Potential implications for captive breeding. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 123, 63–69. doi:10.1016/j.applanim.2009.12.013
- Jones, M.A., Mason, G., Pillay, N., 2011. Early environmental enrichment protects captive-born striped mice against the later development of stereotypic behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 135, 138–145. doi:10.1016/j.applanim.2011.08.015
- Jones, M.A., Mason, G.J., Pillay, N., 2011. Correlates of birth origin effects on the development of stereotypic behaviour in striped mice, *Rhabdomys*. *Anim. Behav.* 82, 149–159. doi:10.1016/j.anbehav.2011.04.010
- Kallnik, M., Elvert, R., Ehrhardt, N., Kissling, D., Mahabir, E., Welzl, G., Faus-Kessler, T., Hrabé De Angelis, M., Würst, W., Schmidt, J.R., Hö Lter, S.M., 2007. Impact of IVC housing on emotionality and fear learning in male C3HeB/FeJ and C57BL/6J mice. *Mamm. Gen.* 18 (3) , pp 173–186. doi:10.1007/s00335-007-9002-z
- Kennes, D., de Rycke, P.H., 1988. The influence of the performance of stereotypies on plasma corticosterone and eosinophil levels in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) In: Unshelm, J., van Putten, G., Zeeb, K., Ekesbo, I. (Eds.), *Proceedings of the International Congress on Applied Ethology in Farm Animals*. KTBL, Darmstadt, pp.238–240. *Applied Ethology in Farm Animals*. KTBL, Darmstadt, pp 238–240.
- Kjaer, J.B., Hjarvard, B.M., Jensen, K.H., Hansen-Møller, J., Naesbye Larsen, O., , 2004. Effects of haloperidol, a dopamine D2 receptor antagonist, on feather pecking behaviour in laying hens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 77–91. doi:10.1016/j.applanim.2003.11.009
- Koolhaas, J., Korte, S., De Boer, S., Van Der Vegt, B., Van Reenen, C., Hopster, H., De Jong, I., Ruis, M.A., Blokhuis, H., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 925–935. doi:10.1016/S0149-7634(99)00026-3
- Koolhaas, J.M., de Boer, S.F., Coppens, C.M., Buwalda, B., 2010. Neuroendocrinology of

- coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 307–321. doi:10.1016/j.yfrne.2010.04.001
- Kuleskaya, N., Voikar, V., 2014. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. *Physiol. Behav.* 133, 30–38. doi:10.1016/j.physbeh.2014.05.006
- Kuo, M.T., Jong, D.S., Lai, W.S., 2011. A biological validation procedure for the measurements of fecal outputs and fecal cortisol metabolites in male Syrian hamsters. *Chin. J. Physiol.* doi:10.4077/CJP.2011.AMM068
- Ladewig, J., de Passille, A.M., Rushen, J., Schouten, W., Terlouw, E.M.C., von Borell, E., 1993. Stress and the physiological correlates of stereotypic behaviour. In: Lawrence, A.B., Rushen, J. Eds., *Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare*. CAB International, Wallingford, pp. 97–118.
- Latham, N., Mason, G., Ader, D., Johnson, S.B., Huang, S., Riley, W., 2004. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 261–289. doi:10.1016/j.applanim.2004.02.006
- Lattouf, R., Younes, R., Lutomski, D., Naaman, N., Godeau, G., Senni, K., Changotade, S., 2014. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 751–8. doi:10.1369/0022155414545787
- Leach, M.C., Ambrose, N., Bowell, V.J., Morton, D.B., 2000. The Development of a Novel Form of Mouse Cage Enrichment. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 3, 81–91. doi:10.1207/S15327604JAWS0302_1
- Lecca, D., Piras, G., Driscoll, P., Giorgi, O., Corda, M.G., 2004. A differential activation of dopamine output in the shell and core of the nucleus accumbens is associated with the motor responses to addictive drugs: a brain dialysis study in Roman high- and low-avoidance rats. *Neuropharmacology* 46, 688–699. doi:10.1016/j.neuropharm.2003.11.011
- Lewejohann, L., Reinhard, C., Schrewe, a., Brandewiede, J., Haemisch, a., Görtz, N., Schachner, M., Sachser, N., 2006. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes, Brain Behav.* doi:10.1111/j.1601-183X.2005.00140.x
- Lewis, R., Hurst, J., 2004. The assessment of bar chewing as an escape behaviour in laboratory mice. *Anim. Welf.* 13 (1), 19–25(7).
- Logge, W., Kingham, J., Karl, A.T., 2013. Behavioural consequences of IVC cages on male and female C57BL/6J mice. *Neuroscience* 237, 285–293. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.02.012
- Lorenz, K., 1978. *Vergleichende Verhaltensforschung: Grundlagen der Ethologie* - K. Lorenz.

-
- Lowder, T., Padgett, D.A., Woods, J.A., 2005. Moderate exercise protects mice from death due to influenza virus. *Brain. Behav. Immun.* 19, 377–380. doi:10.1016/j.bbi.2005.04.002
- Mason, G., Clubb, R., Latham, N., Vickery, S., 2007. Why and how should we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 102, 163–188. doi:10.1016/j.applanim.2006.05.041
- Mason, G.J., 1991. Stereotypies: a critical review 41, 1015–1037.
- Mason, G.J., 1991. Stereotypies and suffering. *Behav. Processes* 25, 103–115. doi:10.1016/0376-6357(91)90013-P
- Mason, G.J., Latham, N.R., 2004. Can't stop, won't stop: Is stereotypy a reliable animal welfare indicator? *Anim. Welf.* doi:10.2307/4493573
- Mcbride, S.D., Cuddeford, D., 2001. The putative welfare-reducing effects of preventing equine stereotypic behaviour. *Anim. Welf.* 10 (2), pp. 173-189(17).
- Meyer-Holzappel, M., 1968. Abnormal behavior in zoo animals. In: *Abnormal Behavior in Animals* (Ed. by M. W. Fox), pp. 476-503. Philadelphia: W. B. Saunders.
- Mills, D., Luescher, A., 2006. Veterinary and pharmacological approaches to abnormal repetitive behaviour. In: Mason, G., Rushen, J. (Eds.), *Stereotypic Animal Behaviour. Fundamentals and Applications to Welfare*. CAB International, Wallingford, pp. 286–324.
- Mineur, Y.S., Crusio, W.E., 2009. Behavioral effects of ventilated micro-environment housing in three inbred mouse strains. *Physiol. Behav.* 97, 334–340. doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.039
- Mineur, Y.S., Crusio, W.E., 2002. Behavioral and neuroanatomical characterization of FVB/N inbred mice. *Brain Res. Bull.* 57, 41–47. doi:10.1016/S0361-9230(01)006359
- Morgan, K.N., Tromborg, C.T., Adamec, R., Kent, P., Anisman, H., Shallow, T., 2007. Sources of stress in captivity. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 102, 262–302. doi:10.1016/j.applanim.2006.05.032
- Mostard, K.E.M., 2011. General understanding , n euro-endocrinologic and (epi) genetic factors of stereotypy 0–30.
- Myers, M.M., Brunelli, S.A., Squire, J.M., Shindeldecker, R.D., Hofer, M.A., 1989. Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. *Dev. Psychobiol.* 22, 29–53. doi:10.1002/dev.420220104
- Nathans, J., 1999. The Evolution and Physiology of Human Review Color Vision: Insights from Molecular Genetic Studies of Visual Pigments. *Neuron.* doi:10.1016/S0896-6273(00)80845-4
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B., 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293.
- Nelson, A., Killcross, S., 2006. Amphetamine Exposure Enhances Habit Formation. *J. Neurosci.* 26, 3805–3812. doi:10.1523/JNEUROSCI.4305-05.2006
-

-
- Nevison, C.M., Hurst, J.L., Barnard, C.J., 1999. Why do male ICR(CD-1) mice perform bar-related (stereotypic) behaviour? *Behav. Processes* 47, 95–111.
- Nevison, C.M., Barnard, C.J., Beynon, R.J., Hurst, J.L., 2000. The consequences of inbreeding for recognizing competitors. *Proceedings. Biol. Sci.* 267, 687–94. doi:10.1098/rspb.2000.1057
- Novak J, Bailoo JD, Melotti L, Rommen J, Würbel H., 2015. An Exploration Based Cognitive Bias Test for Mice: Effects of Handling Method and Stereotypic Behaviour. *PLoS ONE* 10(7): e0130718. doi:10.1371/journal.pone.0130718
- Novak, J., Bailoo, J.D., Melotti, L., Würbel, H., 2016. Effect of Cage-Induced Stereotypes on Measures of Affective State and Recurrent Perseveration in CD-1 and C57BL/6 Mice. *PLoS One*;11(5):e0153203. doi: 10.1371/journal.pone.0153203.
- Ödberg FO, Mers L, 1998: Rate-dependent effect of fluoxetine on captivity-induced stereotypies in bank voles. In: *Proceedings of the 32nd Congress of ISEA*. P. 179
- Ödberg, F., 2006. Is it Ethical to Physically Prevent Horses Performing Oral Stereotypes? *Stereotypic Anim. Behav. Fundam. Appl. to Welf.* 40–40.
- Olsson, I.A.S., Dahlborn, K., 2002. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of “environmental enrichment”. *Lab. Anim.* 36, 243–70.
- Palme, R., 2005. Measuring Fecal Steroids: Guidelines for Practical Application. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1046, 75–80. doi:10.1196/annals.1343.007
- Paulo, M.S.L., Santos, F.T.B. dos, Rocha, P.G., Silva, M. de B., Cintra, L.C., Motta, L.L. da, Errera, F.I.V., Paulo, D.N.S., Nunes, T.A., 2013. Immunoexpression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in spleen of splenectomized rats with preservation of inferior pole, submitted to hyperbaric oxygenation. *Acta Cirúrgica Bras.* 28, 691–695. doi:10.1590/S0102-86502013001000001
- Pawlowicz, A., Demner, A., Lewis, M.H., 2010. Effects of access to voluntary wheel running on the development of stereotypy. *Behav. Processes* 83, 242–246. doi:10.1016/j.beproc.2009.11.008
- Pluim, B.M., Zwinderman, A.H., van der Laarse, A., van der Wall, E.E., 2000. The athlete’s heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 101, 336–44.
- Porsolt, R.D., LE Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732. doi:10.1038/266730a0
- Poulsen, E.M., Honeyman, V., Valentine, P.A., Teskey, G.C., 1996. Use of fluoxetine for the treatment of stereotypical pacing behavior in a captive polar bear. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 1470–4.
- Powell, S.B., Newman, H. a., Pendergast, J.F., Lewis, M.H., 1999. A rodent model of spontaneous stereotypy: Initial characterization of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiol. Behav.* doi:10.1016/S0031-9384(98)00303-5
- Powell, S.B., Newman, H. a, McDonald, T. a, Bugenhagen, P., Lewis, M.H., 2000. Development of spontaneous stereotyped behavior in deer mice: effects of early and
-

- late exposure to a more complex environment. *Dev Psychobiol.*
- Proietti Onori, M., Ceci, C., Laviola, G., Macrì, S., 2014. A behavioural test battery to investigate tic-like symptoms, stereotypies, attentional capabilities, and spontaneous locomotion in different mouse strains. *Behav. Brain Res.* 267, 95–105. doi:10.1016/j.bbr.2014.03.023
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T., Dingemanse, N.J., 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biol. Rev.* 82, 291–318. doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00010.x
- Réale, D., Garant, D., Montiglio, P.O., 2010. Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 365(1560): 4051–4063. doi: 10.1098/rstb.2010.0208
- Richter, H., Ambrée, O., Lewejohann, L., Herring, A., Keyvani, K., Paulus, W., Palme, R., Touma, C., Schäbitz, W.-R., Sachser, N., 2008. Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Protection or symptom? *Behav. Brain Res.* 190, 74–84. doi:10.1016/j.bbr.2008.02.005
- Richter, S.H., Garner, J.P., Würbel, H., 2009. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat. Methods* 6, 257–61. doi:10.1038/nmeth.1312
- Richter, S.H., Gass, P., Fuss, J., 2014. Resting Is Rusting: A Critical View on Rodent Wheel-Running Behavior. *Neuroscientist* 20, 313–325. doi:10.1177/1073858413516798
- Romijn, J.A., Coyle, E.F., Sidossis, L.S., Gastaldelli, A., Horowitz, J.F., Endert, E., Wolfe, R.R., 1993. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am. J. Physiol.* 265, E380-91.
- Ruis, M.A., te Brake, J.H., van de Burgwal, J.A., de Jong, I.C., Blokhuis, H.J., Koolhaas, J.M., 2000. Personalities in female domesticated pigs: behavioural and physiological indications. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 66, 31–47. doi:10.1016/S0168-1591(99)0007022
- Running, A., 2015. Decreased Cortisol and Pain in Breast Cancer: Biofield Therapy Potential. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2015, 870640. doi:10.1155/2015/870640
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*
- Ryan, B.C., Young, N.B., Crawley, J.N., Bodfish, J.W., Moy, S.S., 2010. Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain. *Behav. Brain Res.* 208, 178–88. doi:10.1016/j.bbr.2009.11.031
- Sacchetti, M., Saltin, B., Osada, T., van Hall, G., 2002. Intramuscular fatty acid metabolism in contracting and non-contracting human skeletal muscle. *J. Physiol.* 540, 387–95. doi:10.1113/jphysiol.2001.013912
- Samraus, H.H., 1997. *Das Buch vom Tierschutz : 55 Tabellen.* Enke.
- Schaefer-Korting, M., Weindl, G., Kral, V., Plendl, J., Thoene-Reineke, C., Lauster, R., Pries, A., Preissner, R., Weber, M., Kleuser, B., Luch, A., Schoenfelder, G., 2015. The

-
- Berlin-Brandenburg Research Platform BB3R and integrated graduate school., in: EUSAAT 2015 - 16th Annual Congress of EUSAAT . Linz, Austria.
- Schauwecker, P.E., 2012. Strain differences in seizure-induced cell death following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 45, 297–304. doi:10.1016/j.nbd.2011.08.013
- Schmoock, M., 2004. Ursachen stereotypen Verhaltens der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*). Dissertation.
- Schoenecker, B., Heller, K., 2001. The involvement of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) in stress-induced stereotypies in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 73, 311–319. doi:10.1016/S0168-1591(01)00143-5
- Schoenecker, B., Heller, K., 2000. Indication of a genetic basis of stereotypies in laboratory-bred bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 68, 339–347. doi:10.1016/S0168-1591(00)00114-3
- Schoenecker, B., Heller, K., Freimanis, T., 2000. Development of stereotypies and polydipsia in wild caught bank voles (*Clethrionomys glareolus*) and their laboratory-bred offspring.: Is polydipsia a symptom of diabetes mellitus? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 68, 349–357. doi:10.1016/S0168-1591(00)00108-8
- Schoenecker, B., Heller, K., Barbee, J., Barwick, V., Jones, D., Richter, J., 2003. Stimulation of serotonin (5-HT) activity reduces spontaneous stereotypies in female but not in male bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 80, 161–170. doi:10.1016/S0168-1591(02)00210-1
- Schumacher, F., Chakraborty, S., Kleuser, B., Gulbins, E., Schwerdtle, T., Aschner, M., Bornhorst, J., 2015. Highly sensitive isotope-dilution liquid-chromatography-electrospray ionization-tandem-mass spectrometry approach to study the drug-mediated modulation of dopamine and serotonin levels in *Caenorhabditis elegans*. *Talanta* 144, 71–9. doi:10.1016/j.talanta.2015.05.057
- Schwaibold, U., Pillay, N., Abrams, D., Bruno, J., Brooks, P., Cooper, J., Nicol, C., Dantzer, R., Fentress, J., Fox, M., Huck, U., Banks, E., Kennes, D., Ödberg, F., Bouquet, Y., Rycke, P., Kiley, M., Lewis, M., Gluck, J., Beauchamp, A., Mason, G., Mason, G., Mittleman, G., Jones, G., Robbins, T., Ödberg, F., Palya, W., Zacny, J., Pillay, N., Rushen, J., Schoenecker, B., Heller, K., Smith, L., Sprague, R., VandenBos, G., Wiedenmayer, C., Wood-Gush, D.G., Würbel, H., Stauffacher, M., 2001. Stereotypic behaviour is genetically transmitted in the African striped mouse *Rhabdomys pumilio*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 74, 273–280. doi:10.1016/S0168-1591(01)00169-1
- Scott, K., Ibarra-Soria, X., Nakahara, T.S., Lilue, J., Jiang, Y., Trimmer, C., Souza, M.A., Netto, P.H., Ikegami, K., Murphy, N.R., Kusma, M., Kirton, A., Saraiva, L.R., Keane, T.M., Matsunami, H., Mainland, J., Papes, F., Logan, D.W., 2017. Variation in olfactory neuron repertoires is genetically controlled and environmentally modulated.
-

- doi:10.7554/eLife.21476.001
- Seiden, D., 1976. A quantitative analysis of muscle cell changes in compensatory hypertrophy and work-induced hypertrophy. *Am. J. Anat.* 145, 459–465. doi:10.1002/aja.1001450405
- Shepherd, S.O., Cocks, M., Tipton, K.D., Ranasinghe, A.M., Barker, T.A., Burniston, J.G., Wagenmakers, A.J.M., Shaw, C.S., 2012. Preferential utilization of perilipin 2-associated intramuscular triglycerides during 1 h of moderate-intensity endurance-type exercise. *Exp. Physiol.* 97, 970–980. doi:10.1113/expphysiol.2012.064592
- Shivji, K.K., Kenny, M.K., Wood, R.D., 1992. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69, 367–74.
- Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis, 2013. , In: *Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 1–109. doi:10.1002/9783527679188.oth1
- Simpson, R.J., Lowder, T.W., Spielmann, G., Bigley, A.B., LaVoy, E.C., Kunz, H., 2012. Exercise and the aging immune system. *Ageing Res. Rev.* 11, 404–420. doi:10.1016/j.arr.2012.03.003
- Smallwood, P.M., Olveczky, B.P., Williams, G.L., Jacobs, G.H., Reese, B.E., Meister, M., Nathans, J., 2003. Genetically engineered mice with an additional class of cone photoreceptors: Implications for the evolution of color vision.
- Taketo, M., Schroeder, A.C., Mobraaten, L.E., Gunning, K.B., Hanten, G., Fox, R.R., Roderick, T.H., Stewart, C.L., Lilly, F., Hansen, C.T., al., et, 1991. FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2065–9.
- Tannenbaum, J., Bennett, B.T., 2015. Russell and Burch’s 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.*
- Tembrock, G., 1987. *Verhaltensbiologie*, 1. Aufl. ed. Harri Deutsch, Thun.
- Tilly, S.-L.C., Dallaire, J., Mason, G.J., 2010. Middle-aged mice with enrichment-resistant stereotypic behaviour show reduced motivation for enrichment. *Anim. Behav.* 80, 363–373. doi:10.1016/j.anbehav.2010.06.008
- Trexler, E.T., Mccallister, D., Smith-Ryan, A.E., Branca, R.T., 2017. Incidental finding of low brown adipose tissue activity in endurance-trained individuals: Methodological considerations for positron emission tomography HHS Public Access 3.
- Tschanz B., 1985. Kriterien für die Beurteilung von Haltungssystemen für landwirtschaftliche Nutztiere aus ethologischer Sicht. *Tierärztl Umschau* 40: 730–738.
- van Loon, L.J.C., Koopman, R., Stegen, J.H.C.H., Wagenmakers, A.J.M., Keizer, H.A., Saris, W.H.M., 2003. Intramyocellular lipids form an important substrate source during moderate intensity exercise in endurance-trained males in a fasted state. *J. Physiol.* 553, 611–25. doi:10.1113/jphysiol.2003.052431
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental

- enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191–8. doi:10.1038/35044558
- Vandebroek, I., Berckmoes, V., Ödberg, F.O., 1998. Dissociation between MK-801- and captivity-induced stereotypies in bank voles. *Psychopharmacology (Berl)*. 137, 205–214. doi:10.1007/s002130050612
- Vandebroek, I., Odberg, F.O., 1997. Effect of apomorphine on the conflict-induced jumping stereotypy in bank voles. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 863–8. doi:10.1016/S0091-3057(96)00321-8
- Veenema, A.H., Cremers, T.I.F.H., Jongsma, M.E., Steenbergen, P.J., de Boer, S.F., Koolhaas, J.M., 2005. Differences in the effects of 5-HT1A receptor agonists on forced swimming behavior and brain 5-HT metabolism between low and high aggressive mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 178, 151–160. doi:10.1007/s00213-004-2005-5
- Vestergaard, K., 1981. Influence of Fixation on the Behaviour of Sows, in: *The Welfare of Pigs*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 16–32. doi:10.1007/978-94-011-9574-4_2
- Vöikar, V., Kõks, S., Vasar, E., Rauvala, H., 2001. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol. Behav.* 72, 271–281. doi:10.1016/S0031-9384(00)00405-4
- Walter, I., Klaus, S., 2014. METABOLISM AND METABOLIC STUDIES Maternal high-fat diet consumption impairs exercise performance in offspring. *J. Nutr. Sci.* 3. doi:10.1017/jns.2014.55
- Wiedenmayer, C. Brunner, C., 1993. Is stereotyped behaviour in gerbils determined by housing conditions? In: Nichelmann, M. Wierenga, H.K. and Braun S. (eds) *Proceedings of the International Congress on Applied Ethology 1992*. KTBL, Darmstadt, Germany, pp 276-278.
- Wiedenmayer, C., Ågren, G., Zhou, Q., Zhong, W., Archer, J., Archer, J., Broom, D.M., 1996. Effect of cage size on the ontogeny of stereotyped behaviour in gerbils. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 47, 225–233. doi:10.1016/0168-1591(95)00652-4
- Wiedenmayer, C., 1997. The Early Ontogeny of Bar-Gnawing in Laboratory Gerbils. *Anim. Welf.* 6 (3), pp. 273-277(5).
- Wiedenmayer, C., 1997. Causation of the ontogenetic development of stereotypic digging in gerbils. *Anim. Behav.* 53, 461–470. doi:10.1006/anbe.1996.0296
- Wiepkema, P.R., 1983. On the Significance of Ethological Criteria for the Assessment of Animal welfare, in: *Indicators Relevant to Farm Animal Welfare*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 71–79. doi:10.1007/978-94-009-6738-0_10
- Wise, R. a, 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* doi:10.1038/nrn1406
- Witt, R.M., Galligan, M.M., Despinoy, J.R., Segal, R., 2009. Olfactory behavioral testing in the adult mouse. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/949
- Wolfer, D.P., Litvin, O., Morf, S., Nitsch, R.M., Lipp, H.-P., Würbel, H., 2004. Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour. *Nature* 432, 821–2.

- doi:10.1038/432821a
- Wrede, P., Wrede, S., 2013. Charles Darwin - Die Entstehung der Arten - Kommentierte und illustrierte Ausgabe. Wiley.
- Würbel, H., Stauffacher, M., 1996. Prevention of stereotypy in laboratory mice: Effects on stress physiology and behaviour. *Physiol. Behav.* 59, 1163–1170. doi:10.1016/0031-9384(95)02268-6
- Würbel, H., Stauffacher, M., 1997. Age and weight at weaning affect corticosterone level and development of stereotypies in ICR-mice. *Anim. Behav.* 53, 891–900. doi:10.1006/anbe.1996.0424
- Würbel, H., Stauffacher, M., 1998. Physical condition at weaning affects exploratory behaviour and stereotypy development in laboratory mice. *Behav. Processes* 43, 61–69. doi:10.1016/S0376-6357(97)00086-7
- Würbel, H., Freire, R., Nicol, C., 1998. Prevention of stereotypic wire-gnawing in laboratory mice: Effects on behaviour and implications for stereotypy as a coping response. *Behav. Processes* 42, 61–72. doi:10.1016/S0376-6357(97)00062-4
- Würbel, H., 2001. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci.* doi:10.1016/S0166-2236(00)01718-5
- Würbel, H., 2006. The motivational base of cage rodent's stereotypies. In: Mason, G., Rushen, J. (Eds.), *Stereotypic Animal Behaviour. Fundamentals and Applications to Welfare*. CAB International, Wallingford, pp. 86-120.
- Würbel, H., 2007. Environmental Enrichment does not Disrupt Standardisation of Animal Experiments. *ALTEX*;24 Spec No:70-3.
- Würbel, H., Garner, J.P., 2007. NC3Rs #9 Environmental enrichment and systematic randomization Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization.
- Würbel, H., Stauffacher, M., Holst, D., 2010. Stereotypies in Laboratory Mice - Quantitative and Qualitative Description of the Ontogeny of "Wire-gnawing" and "Jumping" in Zur:ICR and Zur:ICR nu. *Ethology* 102, 371–385. doi:10.1111/j.1439-0310.1996.tb01133.x
- Wynchank, D., Berk, M., 1998. Fluoxetine treatment of acral lick dermatitis in dogs: a placebo-controlled randomized double blind trial. *Depress. Anxiety* 8, 21–3.
- Yeghiayan, S.K., Kelley, A.E., 1995. Serotonergic stimulation of the ventrolateral striatum induces orofacial stereotypy. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52, 493–501.
- Zurlo, J., Hutchinson, E., 2014. The state of animal welfare in the context of refinement. *ALTEX* 31, 4–10.
- Zutphen, L.F.M. van., Baumans, V., Beynen, A.C., 2001. *Principles of laboratory animal science: a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results*. Elsevier.

B Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Blutentnahme
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CPU	Nucleus caudatus und Putamen
CSL	Cortisol
CST	Corticosterone
DA	Dopamin
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Essay</i>
ESI	<i>Electrospray Interface</i>
F ₁	erste Tochtergeneration
FELASA	<i>Federation for Laboratory Animal Science Association</i>
GV-Solas	Deutsche Gesellschaft für Versuchstierkunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Achse
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HTA	Hypothalamus
HVA	Homovanillinsäure
ITK	Indirekte Tierkalorimetrie
IVC	Individuell ventilierte Käfige
KGW	Körpergewicht
LC	Flüssigchromatographie
LD	Lipidtröpfchen
LW	Lebenswoche
M.	<i>Musculus</i>
M. m.	<i>Mus musculus</i>
MRL	Max-Rubner-Laboratorium
MS	Massenspektrometer
NAC	Nucleus accumbens

NaOH	Natronlauge
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
ns	Nicht signifikant
PAS	Perjod-Acid-Schiff-Reaktion Färbung
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear Antigen</i>
RQ	Respiratorischer Quotient
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SN	Substantia nigra
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SNpr	<i>Substantia nigra pars reticulata</i>
SR	Pikro-Sirius-Rot Färbung
SRT	Serotonin
ST	stereotyp
TG	Triglycerid
UZS	Uhrzeigersinn
VTA	Area tegmentalis ventralis
W	Versuchswoche

C Abbildungen und Tabellen

C.1 Abbildungen

Abb. 4-1:	Studiendesign dargestellt als zeitlicher Verlauf.	21
Abb. 4-2:	Regalsystem und Kameraplatzierung zur videogestützten Beobachtung der Tiere.	22
Abb. 4-3:	Auflistung der Beobachtungsintervalle und der Gesamtbeobachtungen pro Muttertier während der Erfassung des maternalen Verhaltens.....	23
Abb. 4-4:	Auflistung der Beobachtungsintervalle und der Gesamtbeobachtungen pro Tier während der Erfassung des Nachzuchtverhaltens.....	26
Abb. 4-5:	Konstruktion des Open Fields zur Erfassung des Explorationsverhaltens....	28
Abb. 4-6:	Kombination im Zentrum des Open Fields..	29
Abb. 4-7:	Einteilung des Open Fields in die verschiedenen Zonen.	29
Abb. 4-8:	Bestimmung der Diameter der Kardiomyozyten.	40
Abb. 4-9:	Darstellung der Auswertung der Sirius-Red-Färbung mit ImageJ.	41
Abb. 4-10:	Bestimmung der Querschnittsfläche des <i>M. soleus</i> . F.....	42
Abb. 4-11:	Darstellung der Auswertung der Sirius-Red-Färbung mit Axio Vision.....	43
Abb. 4-12:	PCNA-Färbung der Milz. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abb. 5-1:	Maternales Verhalten 1.....	52
Abb. 5-2:	Maternales Verhalten 2.....	53
Abb. 5-3:	Alter der Stereotypieentwicklung.	54
Abb. 5-4:	Circadiane Rhythmik.	55
Abb. 5-5:	Stereotypie- und Aktivitätslevel.	56
Abb. 5-6:	Explorationsverhalten 1.	59
Abb. 5-7:	Explorationsverhalten 2.	60
Abb. 5-8:	Aktivität im Open Field.	61
Abb. 5-9:	Rotationen im Open Field.....	62
Abb. 5-10:	Seitenpräferenzen der Rotationen.	63
Abb. 5-11:	Distanzen im Open Field.	64
Abb. 5-12:	Durchschnittsgeschwindigkeit.....	65
Abb. 5-13:	Maximalgeschwindigkeit.	66
Abb. 5-14:	Distanzen in der ITK.....	67
Abb. 5-15:	Fress- und Trinkverhalten.	68
Abb. 5-16:	Gruppenabhängige Körpergewichtsentwicklung.....	70
Abb. 5-17:	Körperfettanteil.	71
Abb. 5-18:	Körpermuskelanteil.	71
Abb. 5-19:	Körperlänge 1.	72
Abb. 5-20:	Körperlänge 2.	73
Abb. 5-21:	Herz- und Lebergewicht.....	75

Abb. 5-22: Milz- und Gehirngewicht.	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abb. 5-23: Gewicht braunes Fettgewebe.....	77
Abb. 5-24: Zerebrale Neurotransmittergehalte.	79
Abb. 5-25: Leberglykogen.....	80
Abb. 5-26: Muskelglykogen.	81
Abb. 5-27: Muskeltriglyceride.	83
Abb. 5-29: Kardiomyozytendiameter.	84
Abb. 5-30: Herzkollagengehalt.	85
Abb. 5-31: Querschnitt des <i>M. soleus</i>	86
Abb. 5-32: Anzahl der Myozyten des <i>M. soleus</i>	87
Abb. 5-33: Myozytendiameter des <i>M. soleus</i>	88
Abb. 5-34: Kollagenanteil <i>M. soleus</i>	89
Abb. 5-35: Myozytendiameter des <i>M. quadriceps</i>	90
Abb. 5-36: Kollagenanteil <i>M. quadriceps</i>	91
Abb. 5-37: PCNA-positive Zellen der Milz.	92
Abb. 6-1: Eigenschaften der vier Haupt-Muskelfaser-Typen der Säugetiere.	100
Abb. H-1: SRT und DA im Gesamtgehirn-Lysat.....	147
Abb. H-2: Sektion des Gehirns zur Entnahme spezifischer Areale.....	148
Abb. H-3: SRT und DA in den Gehirnarealen.	149

C.2 Tabellen

Tabelle 4-1: Standardhaltungsbedingungen der Versuchstiere dieser Studie.	20
Tabelle 4-2: Gruppeneinteilung.	22
Tabelle 4-3: Protokoll zur detaillierten Erfassung des maternalen Verhaltens während der ersten 21 Tage <i>post partum</i>	25
Tabelle 4-4: Protokoll zur detaillierten Erfassung des Nachzuchtverhaltens.	27
Tabelle 5-1: Zuchtparameter.	50
Tabelle 5-2: Gruppeneinteilung der Nachkommen.....	54
Tabelle 5-3: Nachzuchtverhalten.	58
Tabelle 5-4: Geschlechterabhängige Körpergewichtsentwicklung.	69
Tabelle 5-5: Organgewichte.	74
Tabelle 5-6: Fäkales Corticosteron.....	78
Tabelle 5-7: Fäkales Cortisol.....	78
Tabelle H-1: Blutwerte.	145
Tabelle H-2: Entwicklung des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung.	146

D Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. B. Kleuser, für die Möglichkeit zur Bearbeitung des Promotionsprojekts, die hervorragende Betreuung, die vielen anregenden Diskussionen und für die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe.

Meinen besonderen Dank möchte ich an Frau PD Dr. habil. S. Krämer richten. Nicht nur für die Entwicklung des Promotionsthemas und die exzellente wissenschaftliche Betreuung, sondern auch dafür, dass sie mich stets unterstützt hat. Die zahlreichen Gespräche auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene werden mir immer als bereichernder und aufbauender Austausch in Erinnerung bleiben.

Außerdem möchte ich allen Gutachtern für die Bereitschaft zur Übernahme der Gutachtertätigkeit danken.

Ich danke allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, der Ernährungstoxikologie, für die Unterstützung während der gesamten Promotion und die vielen unterhaltsamen Momente fernab des Arbeitsalltags. Insbesondere möchte ich Fabian Schumacher aus meiner Arbeitsgruppe und Julia Bornhorst aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Schwerdtle für die Unterstützung und Hilfe während der Probenaufbereitung und für die LC-MS/MS-Analysen danken.

Ich danke dem BMBF für die Förderung der BB3R-Forschungsplattform und damit für die Förderung meiner Arbeit. Allen Initiatoren und Mitgliedern von BB3R möchte ich für die regelmäßigen Treffen, die intensive Betreuung und die zahlreichen Weiterbildungsmöglichkeiten danken. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Vivian Kral für die unkomplizierte Übernahme der Aufgaben als Mentorin. Und damit verbunden: Danke Frau Angela Daberkow, ohne Sie wäre ich so manches Mal vom intensivem Fortbildungsangebot überrannt worden. Laura Pieper möchte ich für die statistische Beratung danken.

Des Weiteren danke ich all den Kollegen meiner Arbeitsgruppe im Max-Rubner-Laboratorium. Anne Petrick, Alice Mika und Henry Bednarczyk – ich danke euch für die bedingungslose Unterstützung bei allen Projekten, die während meiner Promotionszeit angefallen sind. Vor allem aber danke ich euch, für die vielen lustigen Momente, dass ihr mich aufgefangen habt, wenn es notwendig war und dass ihr so die letzten drei Jahre zu einer unvergesslichen Zeit gemacht habt!

Ich danke der Arbeitsgruppe von Frau Prof. S. Klaus, insbesondere Antje Sylvester, Mario Ost und Verena Coleman für die Möglichkeit Triglycerid- und Glykogenanalysen in einem

perfekt organisierten Labor durchführen zu können, das tolle Arbeitsklima und die konstruktiven Gespräche.

Mein Dank gilt auch dem gesamten MRL-Team. Reinhart Kluge danke ich für die Anregungen zur Versuchsplanung und die Zuchtberatung und für die stetig aufmunternden Gespräche. Elke Thom und allen Tierpflegern möchte ich dafür danken, dass ihr mich bei der Durchführung der Versuche und der Organisation von allen anderen Projekten geholfen habt und dafür, dass ihr immer offen für neue Ideen seid. Elisabeth Meyer – vielen Dank, für die perfekte, zeitnahe und unkomplizierte Anfertigung der histologischen Präparate.

Wenke Jonas und Carola Gehrmann danke ich für die Koordinierung und die Unterstützung während der Messungen im NMR und der ITK.

Herrn Thomas Röder möchte ich dafür danken, dass er meinen persönlichen Wünschen zur Konstruktion verschiedener Apparaturen nie Grenzen gesetzt hat.

Außerdem danke ich der gesamten DIfE-IT, insbesondere Herrn Skoruppa, für die Geduld und dafür, dass ich mich jetzt mit vielen technischen Abläufen gut auskenne.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Ablenkung und die Geduld, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben. Insbesondere danke ich von Herzen Juana und Laura für den innigen Beistand in allen Lebenslagen und weil sie immer für mich da sind. Außerdem danke ich ganz besonders Janine, Viola und Juli für das Korrekturlesen der Arbeit.

Und ich danke meiner Familie, vor allem meiner Mama, Birgit und meinen Schwestern, Anne und Jana, für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe und stetige Motivation. Aus tiefstem Herzen danke ich meinen Nichten, Johanna und Antonia, und meinen Neffen, Konrad und Gregor, die mich nie vergessen lassen, was wirklich im Leben zählt!

Und mein lieber Hans, Worte können nicht beschreiben, wie dankbar ich dir bin, dass du mich immer wieder auffängst!

E Lebenslauf

Die Seite 142 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

F Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Nitezki T, Scherneck S, Kleuser B, Krämer S. *An arguable model of hyperphagia – gold thioglucose administration is associated with gastric mucosal rupture*. (accepted for publication in Laboratory Animals, Manuscript Number: LA-13-170)

Nitezki T, Schumacher F, Bornhorst J, Petrick A, Kleuser B, Krämer S. *Tribute to 3R: Stereotypies in FVB/NJ mice – Linking behavior to metabolism*. (submitted in PLoS ONE, Manuscript Number: PONE-D-17-18594, Status: *under review*)

Poster

Nitezki T, Kleuser B, Krämer S. *Genau hingeschaut – Mysteriösem Mausverhalten auf der Spur*. Lange Nacht der Wissenschaften, Juni 2017, Berlin (D)

Nitezki T, Schumacher F, Bornhorst J, Kleuser B, Krämer S. *Stereotypic mice: To use or not to use, that is the question*. 20th European Congress on Alternatives to Animal Testing and 17th Annual Congress of EUSAAT, August 24-27, 2016, Linz (A)

Nitezki T, Kleuser B, Krämer S. *Characterization of Stereotypies in FVB/N-Mice and their impact on immune system and metabolism*. German Pharm-Tox Summit, February 29-March 3, 2016, Berlin (D)

Vorträge

Nitezki T. *Genau hingeschaut – Mysteriösem Mausverhalten auf der Spur*. Lange Nacht der Wissenschaften, Juni 2017, Berlin (D)

Nitezki T. *Charakterisierung von Stereotypien bei Mäusen*. 45. Seminar über Versuchstiere und Tierversuche, 13.-14.09.2016, Berlin (D)

Nitezki T. *Wahlfütterungsversuche zum Farbsehen der Maus*. 45. Seminar über Versuchstiere und Tierversuche, 13.-14.09.2016, Berlin (D)

G Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Charakterisierung von Stereotypen bei der FVB/NJ Maus hinsichtlich metabolischer und immunologischer Aspekte auf die Stoffwechsellistung“

in der Abteilung für Ernährungstoxikologie der Universität Potsdam, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser, selbstständig und ausschließlich unter Benutzung der angegebenen Quellen angefertigt wurde. Ebenfalls bestätige ich, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bisher an einer anderen Hochschule eingereicht wurde.

Tina Nitezki

Nuthetal, den 21.06.2017

H Anhang

H.1 Ergebnisse der Blutentnahmen

Tabelle H-1: Blutwerte. Leukozyten (LEU; $10^3/\mu\text{l}$), Lymphozyten (LYM; $10^3/\mu\text{l}$), Monozyten (MID; $10^3/\mu\text{l}$), Granulozyten (GRA; $10^3/\mu\text{l}$), Thrombozyten (THR; $10^3/\mu\text{l}$), Erythrozyten (ERY; $10^6/\mu\text{l}$), Hämoglobin (HGB; g/dl), Hämatokrit (HCT; %), Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV; fl), Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH; pg), Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC; g/dl), Cholesterin (CHOL; mg/dl), Triglyceride (TG; mg/dl), Lactat (LACT; mmol/l), Glucose (GLUC; mmol/l) in den Versuchswochen 2 (W2), 7 (W7) und 13 (W13) der nicht-stereotypen (nST; n=16) und stereotypen (ST; n=19) FVB/NJ-Mäuse; dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

	W2		W7		W13		Normbereich
	nST	ST	nST	ST	nST	ST	
LEU	5,41 \pm 0,51	4,32 \pm 0,27	7,89 \pm 0,34	6,26 \pm 0,47	2,69 \pm 0,54	1,93 \pm 0,46	3-10 ($10^3/\mu\text{l}$)
LYM	4,76 \pm 0,46	3,79 \pm 0,23	7,28 \pm 0,37	5,74 \pm 0,45	2,19 \pm 0,49	1,14 \pm 0,32	3,4-7,4 ($10^3/\mu\text{l}$)
MID	0,19 \pm 0,05	0,16 \pm 0,04	0,26 \pm 0,06	0,28 \pm 0,05	0,18 \pm 0,08	0,11 \pm 0,04	0-0,6 ($10^3/\mu\text{l}$)
GRA	0,45 \pm 0,07	0,37 \pm 0,03	0,38 \pm 0,06	0,28 \pm 0,06	0,36 \pm 0,06	0,54 \pm 0,07	0,5-3,8 ($10^3/\mu\text{l}$)
THR	790,63 \pm 43,60	731,95 \pm 42,20	857,94 \pm 26,81	864,11 \pm 39,75	512,91 \pm 128,57	544,60 \pm 163,05	750-1250 ($10^3/\mu\text{l}$)
ERY	7,97 \pm 0,37	7,42 \pm 0,31	9,39 \pm 0,08	9,15 \pm 0,15	7,63 \pm 0,88	7,81 \pm 0,70	7-12 ($10^6/\mu\text{l}$)
HGB	13,18 \pm 0,70	12,13 \pm 0,53	14,30 \pm 0,11	14,35 \pm 0,17	11,29 \pm 1,32	12,32 \pm 0,94	10,7-14,5 g/dl
HCT	40,14 \pm 1,73	37,97 \pm 1,50	43,86 \pm 0,38	43,77 \pm 0,61	35,94 \pm 4,16	39,57 \pm 2,60	35-45 (%)
MCV	50,63 \pm 0,24	51,47 \pm 0,25	46,81 \pm 0,19	47,84 \pm 0,45	47,09 \pm 0,25	51,40 \pm 1,69	45-55 (fl)
MCH	16,44 \pm 0,16	16,34 \pm 0,06	15,24 \pm 0,09	15,72 \pm 0,23	14,79 \pm 0,12	15,92 \pm 0,40	11,1-12,7 (pg)
MCHC	32,59 \pm 0,45	31,36 \pm 0,60	32,61 \pm 0,25	38,64 \pm 1,80	31,31 \pm 0,20	31,08 \pm 0,45	22,3-32 (g/dl)
CHOL	140,94 \pm 14,28	107,16 \pm 17,18	191,13 \pm 6,13	202,05 \pm 71,89	199,64 \pm 10,64	164,20 \pm 41,25	55-200 (mg/dl)
TG	284,00 \pm 23,99	267,67 \pm 14,20	403,44 \pm 32,88	370,74 \pm 122,98	335,70 \pm 32,19	340,00 \pm 52,10	70-350 (mg/dl)
LACT	7,00 \pm 0,38	7,92 \pm 0,56	6,25 \pm 0,55	6,89 \pm 0,47	8,76 \pm 0,91	8,70 \pm 0,78	6-10 (mmol/l)
GLU	8,23 \pm 0,41	8,85 \pm 0,47	8,52 \pm 0,30	8,39 \pm 0,34	8,37 \pm 0,97	7,08 \pm 0,90	3,49-11,43 (mmol/l)

Die Blutwerte der FVB/NJ-Mäuse unterscheiden sich zusammengenommen nicht zwischen den nicht-stereotypen und den stereotypen Tieren. Die bei manchen Werten auffälligen Schwankungen zwischen den Versuchswochen können in den unterschiedlichen Entnahmetechniken und Blutvolumina, und dem demzufolge variierenden Verhältnis von EDTA zu Probenmaterial, begründet sein.

H.2 Körpergewicht und Körperzusammensetzung

Tabelle H-2: Entwicklung des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung. Entwicklung des Körpergewichts vom Absatz (KGW Absatz) über die Versuchswochen hinweg (KGW W1 ... KGW W12) in g und des Körperfett- und Muskelanteils in g/10 g KGW in den Versuchswochen 2, 7 und 12 der nicht-stereotypen Tiere und der verschiedenen Formen der Stereotypen (Wire gnawing etc.); dargestellt als Gruppenmittelwerte \pm SD; die Anzahl der Tiere ist indiziert mit (n=...); (Einfaktorielle Varianzanalyse gegenüber nicht-stereotypen Tieren; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

	Nicht-stereotyp (n=16)	Wire gnawing (n=4)	Back flipping (n=10)	Circuit running (n=5)
KGW Absatz	14.74 \pm 2.15	13.75 \pm 1.75	12.67 \pm 1.92	12.12 \pm 1.87
KGW W1	21.31 \pm 2.03	19.50 \pm 1.32	19.96 \pm 2.96	17.21 \pm 0.71*
KGW W2	24.26 \pm 1.87	22.90 \pm 3.10	23.51 \pm 3.15	20.24 \pm 1.61*
KGW W3	25.57 \pm 2.26	24.55 \pm 3.67	24.73 \pm 3.54	20.86 \pm 1.09*
KGW W4	26.55 \pm 2.65	25.88 \pm 4.77	26.10 \pm 4.08	21.54 \pm 1.53*
KGW W5	28.02 \pm 2.85	26.75 \pm 5.00	26.91 \pm 4.60	21.80 \pm 1.50*
KGW W6	29.77 \pm 3.32	23.38 \pm 5.59	27.23 \pm 4.97	21.94 \pm 1.01*
KGW W7	29.88 \pm 3.75	25.05 \pm 4.20	27.76 \pm 4.87	22.40 \pm 2.37**
KGW W8	30.39 \pm 4.01	26.18 \pm 3.85	28.56 \pm 5.49	23.20 \pm 1.51**
KGW W9	31.48 \pm 4.56	26.30 \pm 3.65	29.61 \pm 5.99	23.08 \pm 1.85**
KGW W10	31.37 \pm 4.65	26.08 \pm 3.48	29.53 \pm 5.92	22.88 \pm 1.08**
KGW W11	31.41 \pm 4.10	26.08 \pm 3.35	29.66 \pm 6.12	24.00 \pm 2.05**
KGW W12	31.69 \pm 3.92	26.30 \pm 3.30	29.80 \pm 5.44	24.08 \pm 1.72*
Fett W2	1.11 \pm 0.15	1.11 \pm 0.28	1.00 \pm 0.15	1.05 \pm 0.25
Fett W7	1.56 \pm 0.25	0.99 \pm 0.42	1.20 \pm 0.41	0.59 \pm 0.24
Fett W12	1.69 \pm 0.32	1.17 \pm 0.37	1.27 \pm 0.48	0.57 \pm 0.27
Muskel W2	8.52 \pm 0.26	8.54 \pm 0.32	8.77 \pm 0.21	8.57 \pm 0.42
Muskel W7	7.92 \pm 0.17	8.39 \pm 0.36	8.33 \pm 0.36	8.71 \pm 0.36
Muskel W12	7.76 \pm 0.33	8.16 \pm 0.30	8.12 \pm 0.45	8.67 \pm 0.24

Zusammengenommen unterschieden sich die FVB/NJ-Mäuse, die die Stereotypie des *circuit running* ausübten, am stärksten von nicht-stereotypen Tieren hinsichtlich der Entwicklung des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung.

H.3 Gehirnavspezifische SRT- und DA-Bestimmung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Proben wurden als Extrakte aus Gesamtgehirn-Lysaten gewonnen (Kapitel 4.4.2). Der hierfür verwendete Extraktionspuffer bestand aus 0,02 M Natriumthiosulfat, 0,2 M Perchlorsäure, 500 nM SRT-d₄ (deuterierter SRT-Standard) und 1000 nM DA-d₄ (deuterierter DA-Standard).

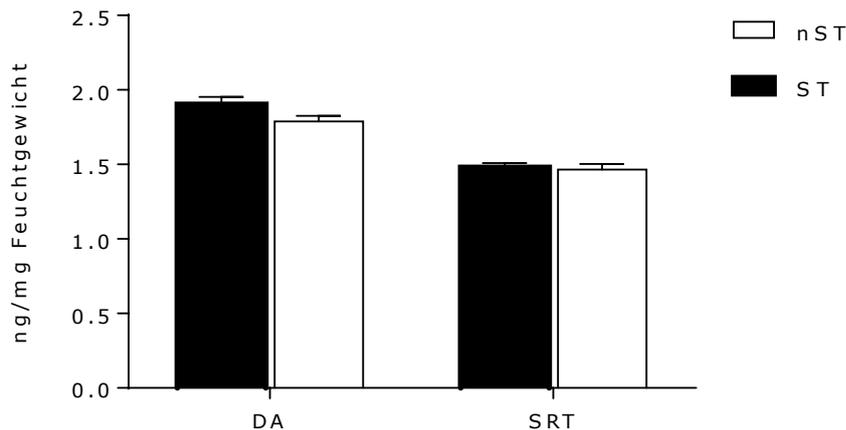


Abb. H-1: SRT und DA im Gesamtgehirn-Lysat. Gehalt an Dopamin (DA) und Serotonin (SRT) in ng/mg Gehirngewicht in Gesamtgehirn-Lysaten, dargestellt als Mittelwert \pm SEM für die nicht-stereotypen (n=16) und stereotypen (n=19) Tiere. Der T-Test unabhängiger Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede.

Es stellten sich keine Unterschiede in den DA- und SRT-Gehalten heraus. Die Gehirne nicht-stereotyper Tiere enthielten $1,79 \pm 0,15$ ng/mg DA und $1,47 \pm 0,14$ ng/mg SRT. Die Gehirne der stereotypen Tiere enthielten $1,90 \pm 0,22$ ng/mg DA und $1,48 \pm 0,12$ ng/mg SRT.

Um in einem weiteren Schritt zu analysieren, ob bei den gehirnavspezifischen Messungen Differenzen in den SRT- und DA-Gehalten zwischen nicht-stereotypen und stereotypen FVB/NJ-Mäusen zu finden sind, wurden weitere Proben genommen. Dazu wurde das frisch entnommene Gehirn auf einen Block gelegt (Steel Brain Matrix 51386, Stoelting, Dublin; IRL), der eisgekühlt wurde und nach einem in der Arbeitsgruppe „Zentrale Regulation des Stoffwechsels“ des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung etablierten Protokoll spezifische Areale entnommen. Dazu wurde das Gehirn zunächst coronal in Scheiben geschnitten. Ausgehend von dem Schnitt bei Bregma (Abb. H-2) wurde bei der Scheibe, die sich durch das Schneiden bei +2 ergab, der Bereich herausgetrennt, der den *Nucleus caudatus* und das Putamen und den *Nucleus accumbens* enthält. Durch einen Schnitt bei -2 ergab sich eine Scheibe, aus der der Hypothalamus isoliert werden konnte. Der Bereich zwischen -2 und -4 enthielt die *Area tegmentalis ventralis* und die *Substantia nigra*, die nun herausgetrennt werden konnten. Die Proben wurden gewogen

und in einem Kryoröhrchen in Stickstoff fixiert und bis zur Probenaufbereitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Probenaufbereitung erfolgte in den Schritten, wie sie für die Probenaufbereitung der Gesamtgehirnhomogenate in dieser Arbeit dargestellt wurde (Kapitel 4.4.2).

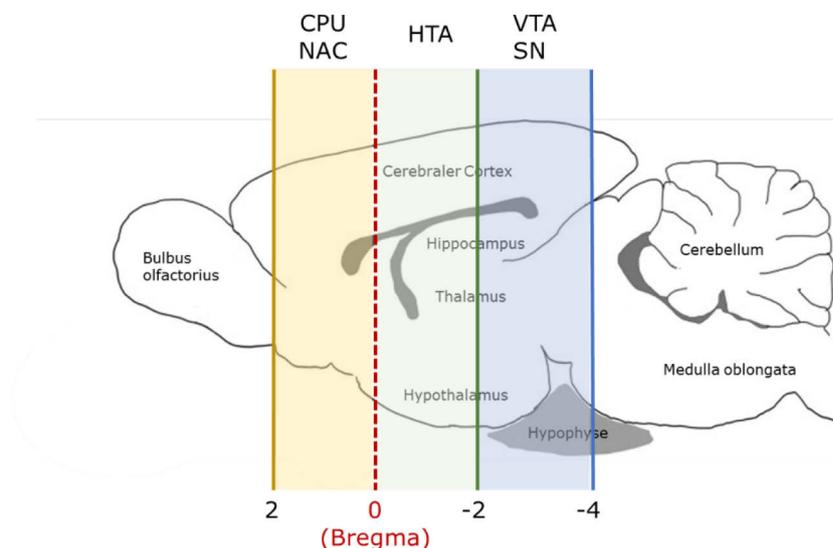


Abb. H-2: Sektion des Gehirns zur Entnahme spezifischer Areale. Die rote Linie indiziert Bregma (o) als Ausgangspunkt. CPU (Nucleus caudatus und Putamen), NAC (Nucleus accumbens), HTA (Hypothalamus), VTA (Area tegmentalis ventralis).

In einem ersten Probedurchlauf wurde der Extraktionspuffer (EP) mit $50\text{ }\mu\text{M}$ SRT-d4 und $100\text{ }\mu\text{M}$ DA-d4 versetzt. Zu den Hypothalamus- (HTA) und Nucleus accumbens- (NAC) Proben wurden je $100\text{ }\mu\text{l}$ des EP hinzugegeben, zu den Proben der Area tegmentalis ventralis (VTA), der Substantia nigra (SN) und des Nucleus caudatus/Putamen (CPU) je $200\text{ }\mu\text{l}$. Die Signale des Massenspektrometers waren allerdings zu hoch. Also wurde in einem zweiten Schritt das Volumen des zugegebenen EP und die Konzentration der Standards auf $100\text{ }\mu\text{M}$ SRT-d4 und $200\text{ }\mu\text{M}$ DA-d4 erhöht. Zu den Proben des HTA wurden nun $300\text{ }\mu\text{l}$ EP hinzugefügt, zu den des NAC, der SN und der VTA wurden je $500\text{ }\mu\text{l}$ EP hinzugegeben und die Proben des CPU wurden mit $1000\text{ }\mu\text{l}$ EP versetzt. Die analysierten Daten konnten nun ausgewertet werden.

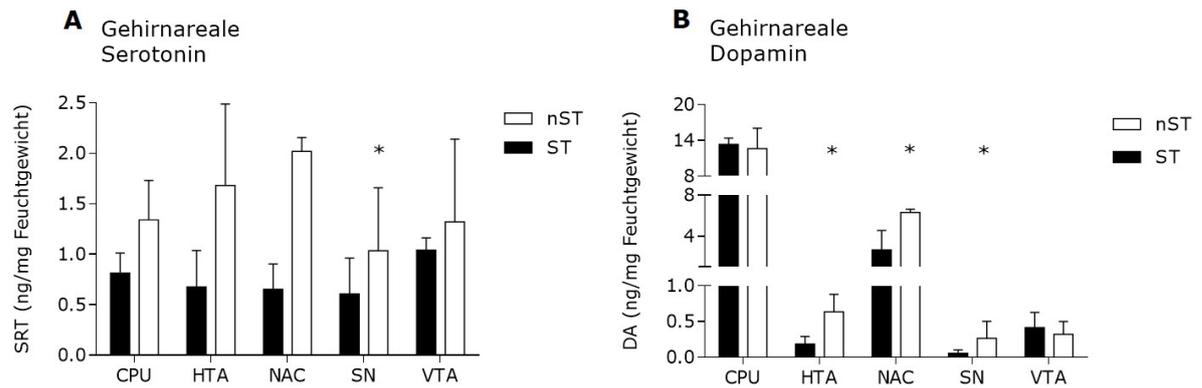


Abb. H-3: SRT und DA in den Gehirnnarealen. Gehalt an (A) Serotonin (SRT) und (B) Dopamin (DA) in ng/mg Gehirngewicht in den verschiedenen Hirnnarealen (CPU=Nucleus caudatus, Putamen; HTA=Hypothalamus; NAC=Nucleus accumbens; SN=Substantia nigra; VTA=Area tegmentalis ventralis), dargestellt als Mittelwert \pm SEM für die nicht-stereotypen (n=4) und stereotypen (n=3) Tiere. T-Test unabhängiger Stichproben; * $p < 0,05$.

Die Daten dieser Voruntersuchungen ergeben signifikante Unterschiede zwischen nicht-stereotypen und stereotypen FVBN/J-Mäusen in den SRT-Gehalten der *Substantia nigra* (nST: $1,04 \pm 0,62$ vs. ST: $0,60 \pm 0,36$ ng/mg, $p < 0,05$) und in den DA-Gehalten des Hypothalamus (nST: $0,64 \pm 0,25$ vs. ST: $0,19 \pm 0,11$ ng/mg, $p < 0,05$), des *Nucleus accumbens* (nST: $6,32 \pm 0,30$ vs. ST: $2,65 \pm 1,89$ ng/mg, $p < 0,05$) und der *Substantia nigra* (nST: $0,27 \pm 0,24$ vs. ST: $0,06 \pm 0,05$ ng/mg, $p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich bei den DA-Gehalten des *Nucleus caudatus* und des Putamen (CPU; nST: $12,63 \pm 1,07$ vs. ST: $13,35 \pm 3,45$ ng/mg) und der *Area tegmentalis ventralis* (VTA; nST: $0,32 \pm 0,18$ vs. ST: $0,41 \pm 0,21$ ng/mg) und in den SRT-Gehalten des *Nucleus caudatus* und des Putamen (CPU; nST: $1,34 \pm 0,39$ vs. ST: $0,82 \pm 0,20$ ng/mg), des Hypothalamus (HTA; nST: $1,68 \pm 0,81$ vs. ST: $0,68 \pm 0,36$ ng/mg), des *Nucleus accumbens* (nST: $2,02 \pm 0,14$ vs. ST: $0,66 \pm 0,25$ ng/mg) und der *Area tegmentalis ventralis* (VTA; nST: $1,32 \pm 0,82$ vs. ST: $1,04 \pm 0,12$ ng/mg).

Zum Teil ergaben sich große Standardabweichungen und die geringe Anzahl der Proben ließ keine zuverlässige Statistik zu. Da die Ergebnisse aber vielversprechend sind, werden die gehirnnarealspezifischen DA- und SRT-Bestimmungen weiter etabliert.