

**Aus dem Institut für Biochemie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**

Zum Einfluss des Genotyps und des Geschlechts auf ausgewählte
Verhaltensparameter einschließlich des sozio-olfaktorischen
Langzeitwiedererkennungsgedächtnisses von Mäusen des
129S1/SvImJ-Stammes und
129S1/SvImJ-C57BL/6JOlaHsd-Hybriden

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Jana Hädicke

aus Magdeburg

Magdeburg, 2013

Jana Hädicke:

Zum Einfluss des Genotyps und des Geschlechts auf ausgewählte Verhaltensparameter einschließlich des sozio-olfaktorischen Langzeitwiedererkennungsgedächtnisses von Mäusen des 129S1/SvImJ-Stammes und 129S1/SvImJ-C57BL/6JolaHsd-Hybriden.

-2013.- 103 Bl.: 26 Abb., 20 Tab., 9 Anl.

Kurzzusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“ und seines volatilen Anteils für das sozio-olfaktorische Langzeitgedächtnis von Mäusen anhand des sozialen Diskriminationstests und seiner Modifikation, dem Lüfterkäfigtest, untersucht. Als Versuchstiere dienten männliche sowie weibliche Tiere des häufig zur Generierung von Mausmutanten verwendeten Stammzellspenderstammes 129S1/SvImJ sowie zwei hybride Linien. Diese entstanden durch die Kreuzung des 129S1/SvImJ-Stammes mit dem Stamm C57BL/6JolaHsd. Es konnte gezeigt werden, dass die Wiedererkennung eines Artgenossen sowohl bei der Verfügbarkeit des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“ als auch nur seines volatilen Anteils unabhängig vom Genotyp und Geschlecht des Versuchstiers ist. Auch der weibliche Zyklus hatte keinen Einfluss auf die olfaktorische Wiedererkennungsleistung weiblicher Versuchstiere. Darüber hinaus wurden im *Open-Field*-Versuch weitere Verhaltensparameter analysiert, bei denen ein Einfluss auf die olfaktorische Wiedererkennung zu vermuten war. Hierbei wurden zusätzlich zu den oben genannten Versuchstieren Männchen und Weibchen des Stammes C57BL/6JolaHsd eingesetzt. Es zeigte sich eine verminderte motorische Aktivität sowie ein vermehrtes angstähnliches Verhalten des Stammes 129S1/SvImJ verglichen mit den C57BL/6JolaHsd-Tieren. Die hybriden Linien lagen mit beiden Verhaltensparametern zwischen den Werten der Parental-generation. Ein Einfluss dieser Verhaltensunterschiede auf die olfaktorische Wiedererkennung konnte nicht nachgewiesen werden.

Schlüsselwörter: Mäuse, Männchen, Aggression, Weibchen, 129S1/SvImJ, 129S1/SvImJxC57BL/6JolaHsd-Hybriden, sozio-olfaktorisches Langzeitgedächtnis, weiblicher Zyklus, *Open-Field*-Versuch

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
1 Einleitung	1
1.1 Das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis.....	1
1.1.1 Der „olfaktorische Fingerabdruck“	2
1.1.2 Der soziale Diskriminationstest und seine Modifikation	5
1.2 Genetische und umweltbedingte Determinanten des Verhaltens von Versuchstieren	6
1.2.1 Die Bedeutung des genetischen Hintergrundes für die Forschung an generierten Mausmutanten	7
1.2.2 Spender- und Empfängerstamm der embryonalen Stammzelle	9
1.2.3 Die Frage nach der optimalen Vergleichsgruppe bei der Forschung an Mausmutanten	10
1.3 Einfluss des Genotyps auf das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis im Hinblick auf die Forschung an Mausmutanten.....	11
1.4 Vor- und Nachteile beim Einsatz weiblicher Versuchstiere	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	17
2.2 Vaginalabstriche	18
2.3 Verhaltensexperimente	19
2.3.1 Versuche zur olfaktorischen Wiedererkennung	20
2.3.2 Versuche im <i>Open Field</i>	24
2.4 Statistische Auswertungen	25
2.4.1 Statistische Auswertungen zur olfaktorischen Wiedererkennung	25
2.4.2 Statistische Auswertungen zum <i>Open-Field</i> -Versuch	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Ergebnisse des <i>Open-Field</i> -Versuchs	28
3.1.1 Aufenthalt im <i>Open Field</i>	28
3.1.2 Überqueren von Linien	29
3.1.3 Verhalten im <i>Open Field</i>	30
3.1.4 Defäkation	33
3.2 Ergebnisse zur olfaktorischen Wiedererkennung.....	34
3.2.1 Der soziale Diskriminationstest: <i>Sampling</i> direkte Exposition – <i>Choice</i> direkte Exposition	34
3.2.2 „Lüfterkäfigtest“: <i>Sampling</i> indirekte Exposition – <i>Choice</i> direkte Exposition	38
3.2.3 „Lüfterkäfigtest“: <i>Sampling</i> indirekte Exposition – <i>Choice</i> indirekte Exposition	40

3.2.4	Einfluss der Art der Jungtierpräsentation auf die <i>Sampling</i> - Investigationsdauer	42
3.2.5	Einfluss des Jungtiergeschlechts auf die Wiedererkennung	42
3.2.6	Einfluss des weiblichen Zyklus auf die Wiedererkennung	43
4	Diskussion	44
4.1	Grenzen des experimentellen Ansatzes	44
4.2	Der <i>Open-Field</i> -Versuch	46
4.3	Olfaktorische Wiedererkennung	49
4.3.1	Zusammenhang von olfaktorischer Wiedererkennung und Jungtiergeschlecht	49
4.3.2	Zusammenhang von olfaktorischer Wiedererkennung und weiblichem Zyklus	49
4.3.3	Aggressivität gegenüber den Jungtieren	52
4.3.4	Investigationsdauer während des <i>Samplings</i>	54
4.3.5	Die Analyse des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses mittels sozialem Diskriminationstest: <i>Sampling</i> direkt – <i>Choice</i> direkt	56
4.3.6	Die Analyse des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses mittels „Lüfterkäfigtest“: <i>Sampling</i> indirekt – <i>Choice</i> direkt	58
4.3.7	Die Analyse des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses mittels „Lüfterkäfigtest“: <i>Sampling</i> indirekt – <i>Choice</i> indirekt	60
4.3.8	Zusammenfassende Betrachtung der Wiedererkennungsleistung über alle drei Versuche	60
4.4	Fazit	64
4.5	Ausblick	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	69
7	Danksagung	80
8	Versicherung an Eides statt	81
9	Darstellung des Bildungsweges	82
10	Anhang	84

Abkürzungsverzeichnis

AOB	akzessorischer Bulbus olfactorius
BZ	Blastozyste
ES	embryonale Stammzelle
EZ	Expositionszeit
Hyb1	Hybridlinie 1 (Kreuzung weiblicher 129S1/SvImJ mit männlichen C57BL/6JOlaHsd-Mäusen)
Hyb2	Hybridlinie 2 (Kreuzung weiblicher C57BL/6JOlaHsd mit männlichen 129S1/SvImJ-Mäusen)
i.A.	im Anhang
JT	Jungtier
KO	<i>Knockout</i>
M	Männchen
min.	Minute(n)
ms	Millisekunde(n)
HHK	Haupthistokompatibilitätskomplex
HUP	Haupturinprotein
RI	<i>Recognition Index</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
VNO	vomeronasales Organ
vs.	versus
W	Weibchen

1 Einleitung

Eines der am häufigsten in der biomedizinischen Forschung verwendeten Versuchstiere ist die Hausmaus, *Mus musculus* (Linnaeus 1758). Als Makrosomat erschließt sie sich insbesondere ihre soziale Umwelt primär über den Geruchssinn. Vor allem die Fähigkeit zur Diskrimination von sippenfremden und bekannten Artgenossen anhand des Geruchs ist für das Zusammenleben von Mäusen in Großfamilien von zum Teil mehr als hundert Tieren unerlässlich. Eibl-Eibesfeldt (1950) fand diesbezüglich bereits in den fünfziger Jahren heraus, dass es bei Mäusen keinen vererbten Familiengeruch gibt, an dem sich die Gruppenmitglieder instinktiv erkennen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Mäuse über ein olfaktorisches Wiedererkennungsgedächtnis verfügen, welches die Ausbildung von komplexen Sozialstrukturen in den Großfamilien ermöglicht.

1.1 Das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis

Im Rahmen experimenteller Untersuchungen zum olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnis bei Mäusen konnten Kogan und Mitarbeiter (2000) zeigen, dass männliche Mäuse, die vorher in kleinen Gruppen gehalten worden waren, Artgenossen bis zu sieben Tage nach Isolation wiedererkennen konnten. Diese Befunde und weitere Veröffentlichungen (Richter et al. 2005, Wanisch et al. 2008, Engelmann 2009, Noack et al. 2010) bestätigen die Annahme, dass Mäuse über ein proteinbiosyntheseabhängiges sozio-olfaktorisches Langzeitgedächtnis verfügen. Die dafür notwendige Geruchsdetektion erfolgt bei Nagern durch das Riechepithel und das vomeronasale Organ (VNO). Das Riechepithel ist der sensorische Ausgangspunkt des hauptolfaktorischen Systems, im VNO hat das akzessorische olfaktorische System seinen sensorischen Ursprung. Beide Systeme sind an der geruchsbasierten Wiedererkennung von Artgenossen beteiligt (Matochik 1988, Bluthé und Dantzer 1993, Brennan und Kendrick 2006, Keller et al. 2009). Neben der Kenntnis über ihre Funktionsweise, bildet das Wissen über die Zusammensetzung des Körpergeruchs von Mäusen eine weitere entscheidende Grundlage für die Erforschung der neuro-

nenalen Verarbeitung eines Geruchseindrucks sowie der damit verbundenen Ausbildung des sozio-olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses.

1.1.1 Der „olfaktorische Fingerabdruck“

Der Geruch eines Tieres enthält Informationen über Geschlecht, Alter, Gesundheit und reproduktiven Status, mithin über Individualität (Brown 1995). Demzufolge ist er für jedes Tier einzigartig und wird deshalb in Anlehnung an den individuellen Fingerabdruck des Menschen als „olfaktorischer Fingerabdruck“ bezeichnet. Dieser „olfaktorische Fingerabdruck“ besteht sowohl aus volatilen, d.h. flüchtigen, durch einen Luftstrom über eine gewisse Distanz erfassbaren, als auch aus nicht-volatilen, nur über direkten Körperkontakt vermittelten Komponenten. Die Verarbeitung dieser beiden Komponenten erfolgt primär in unterschiedlichen Hirnregionen. Lange Zeit ging man davon aus, dass das VNO und das von ihm ausgehende akzessorische olfaktorische System ausschließlich auf die Erfassung von Pheromonen, also auf nicht-volatile Stimuli spezialisiert sei (Wysocki et al. 1980, O'Connell und Meredith 1984, Schilling et al. 1990). Darüber hinaus nahm man an, dass durch das VNO an den *Bulbus olfactorius accessorius* weitergeleitete Informationen nur eine stereotype Verhaltensantwort des Organismus induzieren können. Die Codierung von Individualität hingegen, welche letztlich die Grundlage für die olfaktorische Wiedererkennung bildet, schrieb man allein der Wahrnehmung von volatilen Stimuli durch das Riechepithel und damit dem hauptolfaktorischen System zu (O'Connell und Meredith 1984, Schilling et al. 1990). Heute wird diese strikte Spezialisierung von beiden Systemen allerdings in Frage gestellt. So geht man inzwischen von einer gewissen Überlappung der Funktionen des haupt- und des akzessorischen olfaktorischen Systems aus (Brennan and Zufall 2006, Spehr et al. 2006). Tatsächlich konnte sowohl eine Antwort des VNO auf volatile (Leinders-Zufall et al. 2000, Xu et al. 2005) als auch des hauptolfaktorischen Systems auf nicht-volatile Stimuli (Swann et al. 2001, Brennan und Kendrick 2006) nachgewiesen werden.

Für die Erforschung der neuronalen Verarbeitung der volatilen und nicht-volatilen Geruchskomponenten, die von einem Artgenossen stammen und dem olfaktorischen

Wiedererkennungsgedächtnis bei Mäusen zugrunde liegen, wurde häufig Mausurin eingesetzt. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die hochgradig polymorphen Haupturinproteine (HUPs) und die Haupthistokompatibilitätskomplexe (HHKs) eine wichtige Rolle bei der individuellen Wiedererkennung spielen (Singh et al. 1987, Singh 2001, Nevison et al. 2003, Hurst und Beynon 2004). Diese beiden nicht-volatilen Proteinklassen binden kleine volatile Liganden (Hurst et al. 1998, Armstrong et al. 2005), welche unter Lösung der Bindung aus der flüssigen Phase in die Luft entweichen. Inzwischen geht man davon aus, dass diese volatilen Liganden ebenfalls einen Einfluss auf die Codierung von Individualität haben. Dies gilt insbesondere für jene, die an die HHK-Proteine gebunden sind (Singer et al. 1997, Yamazaki et al. 1999, Leiders-Zufall et al. 2004).

Verhaltensexperimentelle Ansätze zur Bedeutung der volatilen Liganden für die Codierung von Individualität beruhen auf der Beobachtung eines verstärkten Markierungsverhaltens von männlichen Mäusen nach der Detektion der Geruchsspur eines fremden Artgenossen im eigenen Revier. Gaschromatographisch extrahierte, flüchtige Urinanteile, welche einem Männchen im seinem Revier präsentiert wurden, führten im Rahmen dieser Untersuchungen nicht zu einem verstärkten Gebietsmarkierungsverhalten des Revierinhabers (Humphries et al. 1999, Hurst et al. 2005). Die Autoren interpretierten dies dahingehend, dass die volatilen Bestandteile des Urins allein nicht zur Codierung von Individualität ausreichen. Im Gegensatz dazu zeigte die Arbeitsgruppe um Singer (1997) im Y-Labyrinth, dass Mäuse die Fähigkeit besaßen, subtile Unterschiede im volatilen HHK-Ligandenprofil des Urins zu detektieren und so zwischen dem Urin zweier Artgenossen zu unterscheiden. Wieder andere Arbeitsgruppen untersuchten die Bedeutung der volatilen HHK-Liganden für die olfaktorische Wiedererkennung mit Hilfe des „Bruce-Effekts“. Dieser steht für das Phänomen eines induzierbaren Schwangerschaftsabbruchs, wenn das trächtige Weibchen innerhalb von drei Tagen nach der Empfängnis Kontakt mit einem fremden Männchen hat (Bruce 1963, Kaba und Nakanishi 1995, Halpern und Martínez-Marcos 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Präsentation der volatilen Urinkomponenten eines fremden Männchens ausreichen, um einen „Bruce-Effekt“ zu erzeugen (Yamazaki et al. 1983). Die Ergebnisse dieser Versuche liefern

einen weiteren Hinweis für den maßgeblichen Einfluss der flüchtigen Liganden auf die individuelle Wiedererkennung von Mäusen.

Die zum Teil widersprüchlichen Resultate der angeführten Arbeiten lassen erkennen, dass die Bedeutung der einzelnen Komponenten des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ für die Wiedererkennung von Artgenossen noch nicht ausreichend geklärt ist. Ebenso ist festzustellen, dass sich die bisherigen Erkenntnisse fast ausschließlich auf die Verwendung von Mausurin als Stimulus beschränken, also nicht das soziale Wiedererkennungsgedächtnis untersuchen, da dies immer eine Interaktion von Artgenossen voraussetzt. Tatsächlich unterscheidet sich das volatile Profil des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ einer Maus von der Zusammensetzung der volatilen Bestandteile ihres Urins. So sind einige volatile Komponenten, wie beispielsweise Nitromethan, Dimethyldisulfide und 1-Hexanol nur im volatilen Urinprofil nachzuweisen, wohingegen andere volatile Komponenten wie 3-Methyl-Cyclopentanon sowie Benzylmethylketone sich nur im volatilen Profil des Körpergeruchs finden lassen (Röck et al. 2006). Folglich erscheint es eher fraglich, ob Versuchstiere anhand der separaten Präsentation der volatilen Komponente des Urins einer Maus den Urheber dieses Stimulus mittels seines sozialen „olfaktorischen Fingerabdrucks“ identifizieren können. Bislang besteht offensichtlich ein Mangel an experimentellen Ansätzen, die es ermöglichen, dem Versuchstier das gesamte volatile Profil eines Artgenossen zu präsentieren. Einige Arbeitsgruppen versuchten dies, indem sie den Versuchstieren die Schlaflager von Artgenossen durch ein Gitternetz getrennt darboten (Sawyer et al. 1984, Martínez-García et al. 2009). Allerdings kann im Rahmen eines solchen Versuchsaufbaus nicht kontrolliert werden, ob die volatilen Komponenten das Versuchstier auch erreichen, da diese nicht aktiv in dessen Richtung transportiert werden. Zudem ist eine Vollständigkeit des volatilen „olfaktorischen Fingerabdrucks“ durch die alleinige Präsentation des Schlaflagers eines Tieres nicht sicher gewährleistet.

1.1.2 Der soziale Diskriminationstest und seine Modifikation

Eine Möglichkeit, die Bedeutung des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“ sowie seines volatilen Anteils für die Wiedererkennung von Artgenossen zu untersuchen, bietet der soziale Diskriminationstest nach Engelmann und Mitarbeitern (1995) und dessen Modifikation (Noack et al. 2010, Engelmann et al. 2011). Der soziale Diskriminationstest (Engelmann et al. 1995) nutzt die intrinsische Motivation der Maus, einen Artgenossen olfaktorisch zu untersuchen. Anders als in den zuvor beschriebenen Arbeiten, in denen dem Versuchstier nur der Urin oder das Schlaf-lager eines Artgenossen präsentiert wurde, kommt es beim sozialen Diskriminationstest zum direkten Kontakt mit einem als Stimulus dienenden Jungtier. Der direkte Kontakt ermöglicht es dem Versuchstier, den gesamten „olfaktorischen Fingerabdruck“ des Juvenilen zu erfassen. Das Interesse der adulten Maus am präsentierten Stimulustier spiegelt sich in der Zeit wider, die diese für die olfaktorische Untersuchung des Jungtieres aufwendet; sie wird als **Investigationsdauer** bezeichnet. Bei Bekanntheit eines Stimulustieres sinkt das Interesse des Versuchstieres an diesem, was sich in einer verringerten Investigationsdauer ausdrückt. Folglich kann die Investigationsdauer als Maß für den „Bekanntheitsgrad“ eines Stimulustieres gelten. Zeigt das Versuchstier bei der gleichzeitigen Präsentation eines bekannten und eines unbekanntes Jungtieres eine deutlich längere Investigationsdauer gegenüber dem unbekanntes Jungtier, so kann von einem intakten olfaktorischen Gedächtnis ausgegangen werden (Dantzer et al. 1987, Engelmann et al. 1995).

Mit Hilfe der gerade beschriebenen Version des sozialen Diskriminationstests ist es jedoch nicht möglich, die Bedeutung der volatilen und der nicht-volatilen Anteile des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ getrennt voneinander zu analysieren, da das Versuchstier beim direkten Jungtierkontakt immer den gesamten „olfaktorischen Fingerabdruck“ erfassen kann. Um die Bedeutung der volatilen Komponenten des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ für das Wiedererkennen eines Artgenossen zu untersuchen, kann jedoch eine modifizierte Form des sozialen Diskriminationstests genutzt werden (Noack et al. 2010, Engelmann et al. 2011). Diese Modifikation wird im Folgenden als „Lüfterkäfigtest“ bezeichnet. Angelehnt an den bereits

beschriebenen Test der sozialen Diskrimination wird auch hier die Investigationsdauer für ein bekanntes mit der für ein unbekanntes Jungtier verglichen. Eine längere Investigationsdauer für das unbekannte Jungtier wird ebenso als intaktes Wiedererkennungsgedächtnis interpretiert. Die Jungtierpräsentation findet allerdings im Rahmen des veränderten Versuchsaufbaus in einem „Lüfterkäfig“ statt. In diesem ist das Versuchstier räumlich von den Stimulustieren getrennt. Mit Hilfe eines kontinuierlich erzeugten Luftstroms wird gewährleistet, dass nur die flüchtigen Anteile des Jungtiergeruchs das Versuchstier erreichen und von diesem detektiert werden können.

1.2 Genetische und umweltbedingte Determinanten des Verhaltens von Versuchstieren

Der genetische Code eines Organismus hat einen großen Einfluss auf das von ihm gezeigte Verhalten. So weisen Mäuse eines Stammes ein für diesen Stamm charakteristisches Verhaltensprofil auf und unterscheiden sich dadurch von anderen Stämmen der gleichen Art (Thompson 1953, Hay 1980). Mit Hilfe von verschiedenen Verhaltenstests kann man deshalb versuchen, die Unterschiede im Verhalten von Mausstämmen qualitativ sowie quantitativ zu bewerten und so stammesspezifische Verhaltensprofile zu erarbeiten. Dabei ist jedoch zu beachten, dass das Verhalten eines Tieres nicht nur von genetischen, sondern auch durch Umweltfaktoren beeinflusst wird. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das mütterliche Verhalten während der Aufzucht der Jungen (Francis et al. 2003, Bartolomucci et al. 2004) und die Veränderung der Haltungsbedingungen (Owen et al. 1997, Crabbe et al. 1999, Curley et al. 2009) einen Einfluss auf das Verhalten, die endokrine Stressreaktivität (Priebe et al. 2005, Curley et al. 2009) sowie die Hirnentwicklung und Gedächtnisleistung (Liu et al. 2000) der Versuchstiere haben.

1.2.1 Die Bedeutung des genetischen Hintergrundes für die Forschung an generierten Mausmutanten

Die Entwicklung des *Knockout*-Verfahrens in den 1980er Jahren ermöglichte es erstmals, den genetischen Code eines Organismus nicht nur zu entschlüsseln, sondern einzelnen Genen auch ein verhaltensphänotypisches Korrelat zuzuordnen. Diese Zuordnung erfolgt auf der Grundlage eines empirischen Verfahrens, bei dem nach der gezielten Manipulation eines Gens untersucht wird, ob die erzeugte Mausmutante eine Veränderung des Aussehens oder Verhaltens aufweist. Kann eine solche Veränderung nachgewiesen werden, lassen sich daraus Rückschlüsse auf die mögliche Funktion des manipulierten Gens und dessen Genproduktes ziehen. Um Änderungen im Verhalten der generierten Mausmutanten zu detektieren, werden diese standardisierten Verhaltenstests unterzogen. Das Erkennen einer Verhaltensabweichung in diesem Kontext setzt jedoch die Definition eines Normverhaltens für den entsprechenden Mausstamm voraus. Die bekannten Verhaltensunterschiede zwischen den Mausstämmen erfordern deshalb eine genaue Charakterisierung jedes einzelnen Stammes, der zur Erzeugung von Mausmutanten verwendet wird. Dass jedoch die alleinige Kenntnis über das natürliche Verhalten eines Stammes nicht ausreicht, um Rückschlüsse auf die Funktion des manipulierten Gens zu ziehen, verdeutlicht folgende Überlegung: In einem hochkomplexen System wie dem Säugerkörper kann nicht von einer monokausalen Ursache - Wirkungsbeziehung ausgegangen werden. Demnach stellt sich bei jeder beobachteten phänotypischen Veränderung eines genmanipulierten Tieres die Frage, ob allein die Genmanipulation für den Effekt verantwortlich ist, oder ob diese nicht vielmehr auf ein komplexes Zusammenspiel genetischer und Umweltfaktoren zurückgeführt werden muss. So bemängelten einige Wissenschaftler bereits in den 1990er Jahren den unkritischen Umgang mit den Ergebnissen aus der Mausmutanten-Forschung (Crawley 1996, Gerlai 1996, Lathé 1996). Sie wiesen darauf hin, dass die Generierung von Mausmutanten, beispielsweise bei der Erzeugung eines KO-Organismus, meist zu einem gemischten genetischen Hintergrund der Mausmutanten führt, da es seinerzeit noch nicht möglich war, Tiere desselben Mausstammes als Spender und Empfänger der manipulierten embryonalen Stammzelle zu nutzen. Somit entsteht durch das Ein-

bringen einer manipulierten Stammzelle eines Mausstammes (Spendermaus) in die Blastozyste eines anderen Stammes (Empfängermaus) immer eine Mischung der Erbanlagen beider Tiere (Abb. 1). Selbst nach 12 Rückkreuzungen sind noch bis zu 300 Gene des embryonalen Stammzellspenders (~1% des Mausgenoms) in der Mausmutante nachweisbar (Gerlai 1996). Häufig wurden nur drei bis vier Rückkreuzungen vorgenommen, was den Anteil der „Fremdgene“ entsprechend erhöht. Folglich beinhaltet das Genom einer experimentell generierten Mausmutante immer genetische Informationen beider Parentalstämme. Dies macht im Hinblick auf die Untersuchung von bestimmten Verhaltensweisen von Mausmutanten eine genaue Charakterisierung des Verhaltens sowohl des Empfänger- als auch des Spenderstammes notwendig.

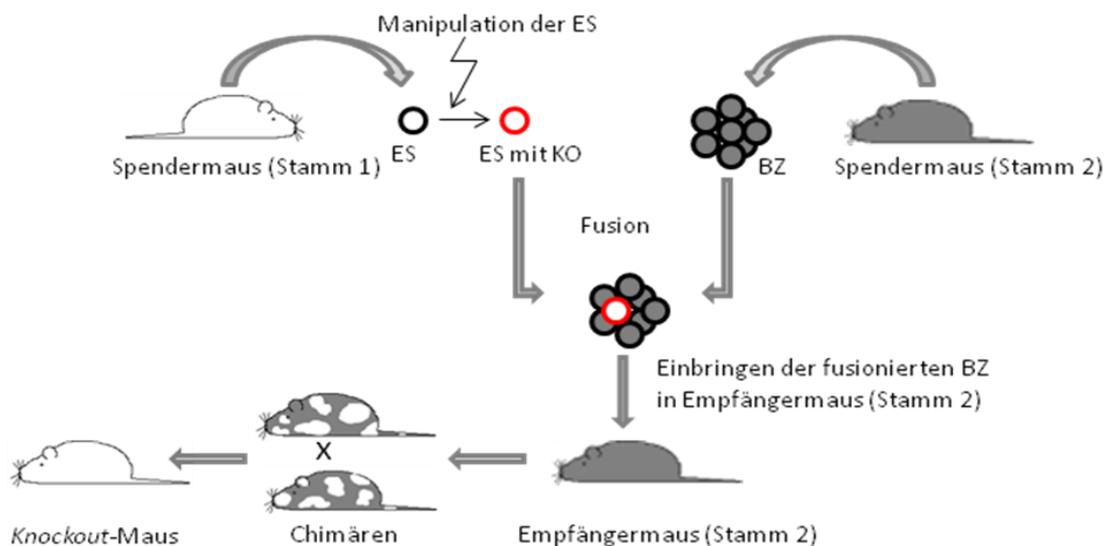


Abb. 1: Herstellung einer Mausmutante im klassischen Verfahren am Beispiel *Knockout*-Maus. Nach Entnahme der embryonalen Stammzelle (ES) aus dem Spenderstamm (Stamm 1) wird diese *in vitro* vermehrt. Anschließend wird das gewünschte *Knockout* (KO) gentechnisch durch Insertion eines Inaktivierungsvektors mittels homologer Rekombination erzeugt. Es folgt die Verschmelzung der manipulierten ES mit der Blastozyste (BZ) eines anderen Mausstammes (Stamm 2). Die entstandene Fusionsblastozyste (enthält Erbanlagen aus beiden Parentalstämmen) wird in eine Empfängermaus eingebracht. Die Blastozysten entwickeln sich zu genetisch chimären Tieren. Diese werden anschließend miteinander gekreuzt. Unter den entstehenden Nachkommen selektiert man diejenigen mit der Fellfarbe des Spenderstammes, da bei ihnen das *Knockout* in die Keimbahn aufgenommen wurde.

1.2.2 Spender- und Empfängerstamm der embryonalen Stammzelle

Als embryonaler Stammzellspender fungiert dabei nahezu ausnahmslos der Stamm 129, da dieser besonders zur Entnahme und Kultivierung der Stammzellen geeignet ist (Smith 1992). Kürzlich wurde auch die Verwendung von C57BL/6N Mäusen als embryonaler Spenderstamm vorgeschlagen, dieses Vorgehen ist jedoch noch nicht etabliert (Skames et al. 2011). Als Empfänger der embryonalen Stammzelle dienen häufig Mäuse vom Stamm C57BL/6 (Smith 1992). Diese haben eine schwarze Fellfarbe und sind daher gut von den braunen 129er-Mäusen zu unterscheiden. Durch die Unterschiede in der Fellfarbe lässt sich so schon optisch ermitteln, ob und in welchem Ausmaß die genetische Information der manipulierten embryonalen Stammzelle des braunen 129-Stammes in chimären Tieren vorhanden ist. Nach Kreuzung der Chimären lassen sich die Nachkommen, die das manipulierte Gen homozygot in die Keimbahn aufgenommen haben, ebenso anhand der Fellfarbe erkennen, da sie farblich dem Spenderstamm der embryonalen Stammzelle ähneln (siehe Abb. 1).

Die Verwendung des 129er-Stammes als Stammzellspender ist deshalb nachteilig, weil sich das Verhalten von Tieren dieses Stammes stark von dem anderer Mausstämme unterscheidet. So gelten als typische Charakteristika der 129er-Mäuse: ein verstärktes angsthähnliches Verhalten (Homanics et al. 1999, Holmes et al. 2002, Hefner et al. 2008), motorisch deutlich verminderte Aktivität (Sik et al. 2003), passives Sozialverhalten (Moy et al. 2007), das schlechte Abschneiden in vielen Gedächtnistests (Balogh et al. 1999, Brooks et al. 2005) sowie hirnstrukturelle Anomalien, wie z. B. eine Dysgenese des *Corpus callosum* (Wahlsten 1982, Ward et al. 1987) und Alterationen der neuronalen Verschaltung, besonders im kortiko-amygdaloiden Schaltkreis (Hefner et al. 2008, Whittle et al. 2010). Allerdings ist zu beachten, dass sich hinter der Stammbezeichnung 129 verschiedene Substämme mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund (Simpson et al. 1997) und erheblichen Verhaltensunterschieden verbergen. Beispielsweise erzielten die Substämme 129/SvEvTac (Crawley 1996, Owen et al. 1997, Holmes et al. 2002) und 129/OlaHsd (Montkowski et al. 1997, Vöikar et al. 2001) gute Lernerfolge im *Morris-Water-*

Maze, wohingegen der Substamm 129/SvJ sehr schlecht abschnitt (Montkowski et al. 1997, Owen et al. 1997). Restivo und Mitarbeiter (2006) zeigten, dass die 129/SvPasCr-Mäuse sogar etwas bessere Leistungen im olfaktorischen Diskriminationslernen aufwiesen als die C57BL/6-Tiere, welchen eine gute Lernfähigkeit zugeschrieben wird. Eine einheitliche Beschreibung des Stammes „129“ ist demzufolge nicht möglich, denn das Unterlassen der Substammbeurteilung kann insbesondere im Rahmen von Lern- und Gedächtnisexperimenten zu Fehleinschätzungen der Leistungsfähigkeit der verwendeten 129er-Tiere führen. Die Differenzierung des exakten Substammes ist jedoch aufwändig und kostspielig. Daher erfolgt beim Kauf einer generierten Mausmutante die Angabe der genauen Herkunft der verwendeten Stammzelle oft unvollständig oder gar nicht (Contet et al. 2001b). In vielen Publikationen findet der genaue 129er-Substamm, der zur Erzeugung der Mausmutanten genutzt wurde, überhaupt keine Erwähnung. Somit kann nicht nachvollzogen werden, ob das als abnorm dargestellte Verhalten der Mausmutanten nicht auch schon bei dem verwendeten 129er-Spenderstamm vorliegt und somit nicht zweifelsfrei der generierten Mutation zugeordnet werden kann.

1.2.3 Die Frage nach der optimalen Vergleichsgruppe bei der Forschung an Mausmutanten

Die hier nur beispielhaft aufgezeigten genetischen und umweltbedingten Effekte führen im Kontext der Forschung an Mausmutanten zu der Frage nach der optimalen Vergleichsgruppe für Experimente mit generierten Mausmutanten. Die häufig verwendeten Wildtypen, d.h. Mäuse des Stammes der Empfängermaus ohne Mutation, sind offensichtlich keine geeigneten Kontrolltiere. Ihnen fehlen die meist mehr als 300 „Fremdgene“ des Stammzellspenders, die das mutierte Gen flankieren. Außerdem stammt die Kontrollgruppe häufig aus der Eigenzucht, die Mausmutanten hingegen aus einem der großen Zuchtlabore. Damit weichen nicht nur der genetische Hintergrund, sondern auch die umweltbedingten Einflussfaktoren beider Gruppen signifikant voneinander ab.

Einen möglichen Lösungsansatz für dieses Problem bietet, wie bereits beschrieben, die Untersuchung der zwei Parentalstämme, da beide ihre genetischen Informationen

in die Mausmutanten einbringen. Die ausschließliche Betrachtung des Verhaltens der Parentalstämme gibt jedoch noch keinen Aufschluss über mögliche Veränderungen, die aus der Mischung der Erbanlagen beider Parentalstämme resultieren. Bis heute gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Problematik hybrider Tiere auseinandersetzen. Diese zeigen jedoch, dass sich das Verhalten der hybriden F1-Generation nicht allein durch die Mischung des genetischen Hintergrundes der Parentalgeneration erklären lässt. Beispielsweise erzielten F1-Hybriden in komplexen Lern- und Gedächtnistests, wie dem *Morris-Water-Maze*, bessere Leistungen als die Elterntiere (Owen et al. 1997). Auch in Tests auf angstähnliches Verhalten (Kalueff et al. 2007) waren Unterschiede zwischen der Parentalgeneration und den Hybriden nachweisbar. Chesler und Mitarbeiter (2012) berichten über eine deutliche Änderung des Ataxie-Index bei C57BL/6Jx129S1/SvImJ F1-Hybriden im Vergleich mit den Elternstämmen unter Ethanol-Einfluss.

Es ist davon auszugehen, dass sich Verhaltensähnlichkeiten zwischen den Parentalstämmen und den hybriden Tieren am besten zeigen lassen, indem man einen Verhaltenstest wählt, in welchem sich die Parentalstämme möglichst stark unterscheiden. Dies trifft im Bezug auf die Stämme C57BL/6 und 129 sowohl für die motorische Aktivität als auch für das angstähnliche Verhalten zu, wobei die C57BL/6-Mäuse im Vergleich zum 129er-Stamm in der Literatur als weniger ängstlich und deutlich aktiver beschrieben werden (Logue et al. 1997, Homanics et al. 1999, Contet et al. 2001b). Der *Open-Field*-Versuch stellt hierbei eine gute Möglichkeit dar, Mäuse hinsichtlich dieser beiden Verhaltensweisen zu vergleichen.

1.3 Einfluss des Genotyps auf das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis im Hinblick auf die Forschung an Mausmutanten

Die angeführten Ansätze und Überlegungen machen deutlich, dass eine eingehende Untersuchung des Einflusses verschiedener Genprodukte auf die olfaktorische Gedächtnisleistung mit Hilfe von Mausmutanten zunächst die Analyse der olfaktorischen Gedächtnisleistung des verwendeten Stammzellspenders und -empfängers sowie der aus ihnen erzeugten Hybriden voraussetzt. Von besonderem Interesse im Rahmen dieser Dissertation war die Frage, ob sich die in anderen

Gedächtnistests beschriebenen Gedächtnisdefizite des 129er-Stammes auch beim olfaktorischen Gedächtnis finden lassen. Einen Hinweis auf eine mangelhafte olfaktorische Gedächtnisleistung des 129er-Stammes liefert z.B. die Arbeit von Smith und Mitarbeitern (2009). Bei der Investigation von Würfeln, die einen bestimmten Geruch verströmten, konnten C57BL/6-Mäuse deutlich besser als 129/S1SvImJ-Tiere bekannte von unbekanntem Gerüchen unterscheiden. F1-Hybriden der beiden Stämme waren zur Geruchsdiskrimination nicht fähig. Zu bemerken ist jedoch, dass Smith und Mitarbeiter (2009) als Geruchsstoffe Aromen wie Vanille oder Orange nutzten, die in der natürlichen Umgebung der Nager, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielen, da sie, anders als soziale Stimuli, keine intrinsische Informationsqualität enthalten. Demzufolge ist davon auszugehen, dass der „olfaktorische Fingerabdruck“ eines Jungtieres einen vielfältigeren und natürlicheren Stimulus für die Versuchstiere darstellt und somit einen stärkeren Investigationsanreiz liefert (Lee et al. 2003). Auch in der Arbeit von Moy und Mitarbeitern (2007) wird für 129S1/SvImJ-Mäuse eine schlechte olfaktorische Gedächtnisleistung berichtet. Bei der gemeinsamen Präsentation einer bekannten und unbekanntem Maus verbrachten die 129S1/SvImJ-Tiere nicht mehr Zeit mit der unbekanntem Maus. Dies spricht dafür, dass sie die bekannte Maus nicht wiedererkannten. In einer kürzlich erschienenen Publikation berichten Sinai und Mitarbeiter (2012) über ein gestörtes soziales Wiedererkennungsgedächtnis bei 129P2-Mäusen. Folglich ist noch nicht geklärt, ob 129er-Mäuse überhaupt ein intaktes olfaktorisches Wiedererkennungsgedächtnis besitzen.

Für den häufig genutzten Stammzellempfängerstamm C57BL/6JolaHsd konnte gezeigt werden, dass C57BL/6JolaHsd-Männchen und -Weibchen Jungtiere sowohl bei der Präsentation des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“ als auch bei der alleinigen Darbietung seines volatilen Anteils wiedererkannten (Noack et al. 2010, Hädicke und Engelmann 2013). Bisher gibt es allerdings noch keine Untersuchungen über die Bedeutung des volatilen und des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“ für das sozio-olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis von 129er-Mäusen und 129S1/SvImJxC57BL/6JolaHsd-Hybriden.

1.4 Vor- und Nachteile beim Einsatz weiblicher Versuchstiere

Es ist nicht bekannt, ob sich das olfaktorische Gedächtnis von weiblichen und männlichen Mäusen vergleichen lässt. Aufgrund der mangelnden und teils widersprüchlichen Datenlage diesbezüglich werden weibliche Mäuse selten in Lern- und Gedächtnisversuchen eingesetzt. Auch die Bedeutung des weiblichen Zyklus für die Gedächtnisbildung wird noch immer kontrovers diskutiert. Einige Studien konnten einen Einfluss der natürlichen Hormonschwankungen während des weiblichen Zyklus zeigen (Wood et al. 2001, Sánchez-Andrade et al. 2005, Walf et al. 2006, Frye et al. 2007, Walf et al. 2009, Sánchez-Andrade und Kendrick 2011). Die Gedächtnisleistung stellte sich hierbei während des Proöstrus als verbessert dar. Andere Studien konnten hingegen einen solchen Einfluss des weiblichen Zyklus auf das Wiedererkennungsgedächtnis nicht nachweisen (Korol und Kolo 2002, Markham und Juraska 2007). Zu kritisieren ist, dass viele experimentelle Ansätze, die auf die Untersuchung der Zyklusrelevanz abzielen, den Einfluss der vaginalen Stimulation außer Acht lassen. Es ist bekannt, dass eine vaginale Stimulation einen zyklusabhängigen, positiven Einfluss auf die Gedächtnisleistung hat (Guevara-Guzman et al. 2001, Larrazolo-Lopez et al. 2008). Trotzdem werden in vielen Studien die vaginalen Abstriche zur Zyklusbestimmung kurz vor dem Gedächtnisexperiment genommen (Wood et al. 2001, Walf et al. 2006, Frye et al. 2007, Walf et al. 2009). Dadurch lässt sich jedoch nicht mehr zweifelsfrei zuordnen, ob die gezeigte Gedächtnisleistung eine Folge der natürlichen hormonellen Schwankung oder der vaginalen Stimulation ist. Interessanterweise konnten genau die Studien eine Abhängigkeit der Gedächtnisleistung vom weiblichen Zyklus nachweisen, die vor dem Versuch vaginal stimulierten (Wood et al. 2001, Walf et al. 2006, Frye et al. 2007, Walf et al. 2009). Aufgrund des genannten Problems im Design einiger Studien ist ein Einfluss des weiblichen Zyklus auf die olfaktorische Wiedererkennung kritisch zu hinterfragen. Solange die Vergleichbarkeit des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses von männlichen und weiblichen Mäusen jedoch noch nicht abschließend geklärt ist, bleibt der Einsatz von Weibchen im Rahmen von olfaktorischen Gedächtnistests problematisch. Ein möglicher Einfluss des weiblichen Zyklus auf das olfaktorische

Gedächtnis würde zudem auch den Vergleich von Weibchen untereinander erschweren.

Weibliche Mäuse sind jedoch „sozialer“ als die Männchen. Insbesondere die geringere Aggressivität der Weibchen gegenüber den Stimulustieren könnte die Interpretation der Versuche mit direktem Jungtierkontakt erleichtern. Zudem lassen sich die Mausweibchen auch besser in Gruppen halten als ihre männlichen Artgenossen. Es gibt also mehrere Gründe, die Zyklusabhängigkeit sowie die Vergleichbarkeit des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses von Männchen und Weibchen genauer zu untersuchen, um dadurch einen häufigeren Einsatz weiblicher Mäuse im Rahmen des sozialen Diskriminations- und des „Lüfterkäfigtests“ zu erleichtern.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Einflussfaktoren auf das sozio-olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis von Mäusen zu untersuchen. Im Hinblick auf die Forschung an Mausmutanten erfolgte in diesem Zusammenhang zunächst die Analyse des Einflusses des genetischen Hintergrundes von Versuchstieren auf die olfaktorische Gedächtnisleistung. Dabei wurden sowohl der häufig als Stammzellspender bei der Generierung von Mausmutanten eingesetzte Stamm 129S1/SvImJ als auch die durch dessen Kreuzung mit dem Empfängerstamm C57BL/6J OlaHsd entstehenden hybriden Linien untersucht. Es sollte zum einen geklärt werden, ob die in der Literatur beschriebenen Gedächtnisdefizite der 129S1/SvImJ-Mäuse auch deren olfaktorisches Wiedererkennungsvermögen beeinträchtigen und zum anderen, ob sich ein Einfluss des gemischten genetischen Hintergrundes der hybriden Versuchstiere auf die olfaktorische Gedächtnisleistung zeigt. Die Analyse des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses der Versuchstiere erfolgte dabei mit Hilfe des sozialen Diskriminationstests und seiner Modifikation, dem „Lüfterkäfigtest“. Der Einsatz beider Methoden ermöglichte es, sowohl die Bedeutung des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“ als auch nur die seines volatilen Anteils für die Ausbildung und das Abrufen des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses zu überprüfen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bei männlichen und weiblichen C57BL/6J OlaHsd-Mäusen die Präsentation nicht nur des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“, sondern auch seiner volatilen Komponenten für eine erfolgreiche olfaktorische Diskrimination ausreichen (Richter et al. 2005, Wanisch et al. 2008, Noack et al. 2010, Hädicke und Engelmann 2013).

Um einen Einfluss anderer Faktoren auf die Ausbildung des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses in den durchgeführten Versuchen zu ermitteln, sollten die Stämme 129S1/SvImJ, C57BL/6J OlaHsd sowie die beiden hybriden Linien zudem bezüglich ihres Verhaltens im *Open Field* untersucht werden. Hierbei lag der Fokus auf möglichen Unterschieden zwischen den beiden Parentalgenerationen in ihrer motorischen Aktivität sowie dem angsthäufigen Verhalten und auf deren Ausprägung in der F1-Generation. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob diese

Unterschiede im Verhalten der Mausstämme Auswirkungen auf die Ausbildung und das Abrufen des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses haben.

Schließlich sollte durch den Einsatz weiblicher Mäuse in den Versuchen der Einfluss des Geschlechts auf das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis und das Verhalten im *Open Field* untersucht werden. Bei den Weibchen wurde auch überprüft, ob der hormonelle Zyklus Auswirkungen auf die Ausbildung des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses hat.

2 Material und Methoden

Alle Versuche wurden vom Landesverwaltungsamt, Referendariat Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten bewilligt (Aktenzeichen: 42502-2-648 Uni MD) und erfolgten unter strikter Einhaltung der EEC-Auflagen über die Haltung und Verwendung von Versuchstieren.

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienten weibliche und männliche adulte Mäuse. Diese waren zu Beginn der Experimente acht Wochen alt und stammten aus der Tierhaltung des Instituts für Biochemie und Zellbiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (129S1/SvImJ ursprünglich aus Jackson Laboratory, Charles River, Sulzfeld, Deutschland; C57BL/6J0laHsd ursprünglich aus Harlan-Winkelmann, Borchern, Deutschland).

Voraussetzung für diese Arbeit war die Etablierung von zwei hybriden Linien aus Parentaltieren der Stämme C57BL/6J0laHsd und 129S1/SvImJ. Die erste Linie wurde durch Verpaarung von Weibchen des Stammes 129S1/SvImJ mit C57BL/6J0laHsd-Männchen erzeugt. Diese Linie wird im Rahmen der Arbeit als Hyb1 bezeichnet. Die zweite Linie entstand durch die Kreuzung von weiblichen C57BL/6J0laHsd- mit männlichen 129S1/SvImJ-Tieren. Sie wird im weiteren Verlauf Hyb2 genannt. Aus jeder der gewonnenen Linien wurden weibliche und männliche Mäuse für die Versuche eingesetzt. Zusätzlich fand die Untersuchung vergleichbarer Gruppen aus beiden Parentalstämmen statt. Zur exakten genetischen Typisierung des 129er-Substammes wurden nach Abschluss der Experimente Schwanzstücke der hybriden Linien sowie der 129er-Gruppe an das Jackson Laboratory (USA) gesandt, die den Genotyp 129S1/SvImJ bestätigten. Als olfaktorischer Stimulus wurden, wie in anderen Arbeiten auch (Noack et al. 2010), weibliche und männliche Jungtiere vom Stamm C57BL/6J0laHsd verwendet. Diese waren zwischen 24 und 36 Tage alt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standard-

bedingungen (Futter und Wasser *ad libitum*, 12h Tag-Nacht-Rhythmus mit Beginn der Lichtphase um 7.00 Uhr) und in Gruppen von je drei bis sechs Tieren. Alle Experimente wurden in der Lichtphase zwischen 8.00 Uhr bis 15.00 Uhr durchgeführt.

2.2 Vaginalabstriche

Für die Bestimmung der Phase des weiblichen Zyklus erfolgte nach Beendigung jedes Wiedererkennungsexperiments ein Vaginalabstrich bei den weiblichen Versuchstieren. Zur Gewinnung des Materials diente ein in Kochsalzlösung getauchtes Wattestäbchen. Der Abstrich wurde auf einen Objektträger aufgetragen und mit der Übersichtsfärbung nach Nissel gefärbt. Eigene Vorversuche ergaben, dass die Färbung nach Nissel zur Abgrenzung des Östrus von den anderen Zyklusstadien (Di-, Met-, und Proöstrus) ausreichend ist (siehe Abb. 2). Daher wurde sie der sonst üblichen Vaginalabstrichfärbung nach Papanicolaou vorgezogen.

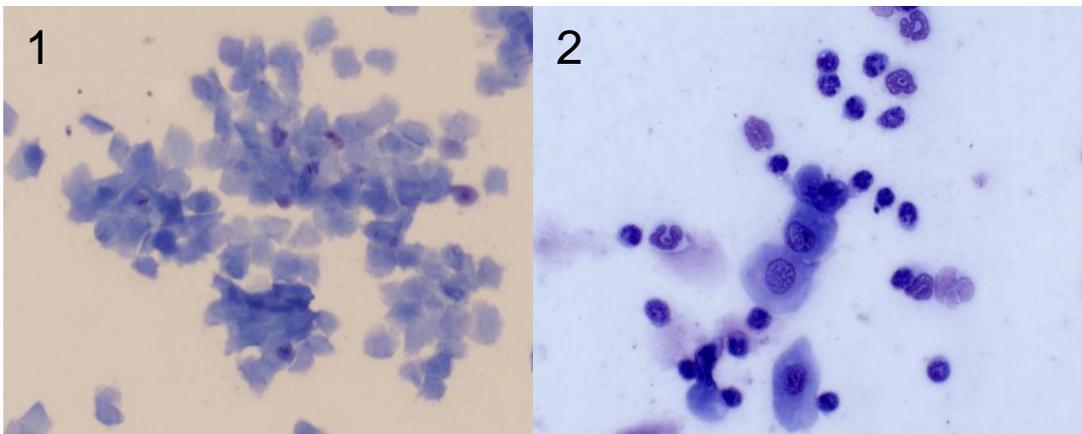


Abb. 2: Vaginalabstrich gefärbt nach Nissel. 1: Östrus, Schollen aus abgeschilferten Zellen ohne Zellkern, keine Leukozyten, wenig Oberflächenzellen; 2: Nicht-Östrus: viele Zellen mit Zellkern, viele Leukozyten, wenig bis keine Schollen, Schleim.

Analysiert wurde der Einfluss des weiblichen Zyklus auf die Ausbildung des olfaktorischen Gedächtnisses während des *Samplings*. Aufgrund der Kürze des weiblichen Zyklus der Maus muss davon ausgegangen werden, dass das Versuchstier zu Beginn des Experiments in einer anderen Zyklusphase war als zum Zeitpunkt des Vaginalabstrichs. Da jedoch die hormonellen Veränderungen als besonders relevant

für die Ausbildung des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses angesehen werden, wurde die Zyklusphase während des *Samplings* für die statistische Auswertung verwendet. Auf der Grundlage der aus anderen Arbeiten (Silberstein et al. 2006) bekannten Längen der einzelnen Zyklusphasen (siehe Abb. 3) wurde auf die während des *Samplings* vermutlich vorherrschende Zyklusphase extrapoliert. Dies erfolgte ausgehend von der festgestellten Zyklusphase durch das Zurückrechnen um 26 Stunden (24 stündiges Retentionsintervall + einer - aus dem experimentellen Ablauf bedingten - zweistündigen Versuchsdauer). Folglich befanden sich Mäuse, deren Vaginalabstrich das Stadium des Östrus zeigte, zum Zeitpunkt des *Samplings* vermutlich im Stadium des Proöstrus. Dem Zyklusabschnitt Proöstrus, der in der Literatur als Phase der verbesserten Gedächtnisleistung beschrieben wird, wurde dabei der Abschnitt des „Nicht-Proöstrus“ gegenüber gestellt. Dieser umfasst die Zyklusstadien Diöstrus, Metöstrus und Östrus.

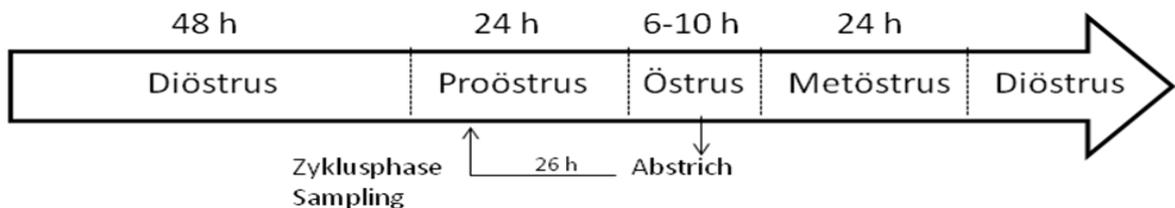


Abb. 3: Dauer der weiblichen Zyklusphasen der Maus mit beispielhafter Darstellung einer möglichen Abstrichentnahme und Extrapolation auf die Zyklusphase während des *Samplings* (26 Stunden davor). Die Dauer der einzelnen Zyklusphasen wurde der Arbeit von Silberstein und Mitarbeitern (2006) entnommen.

2.3 Verhaltensexperimente

Die Tiere absolvierten verschiedene Verhaltenstests in einer festgelegten Reihenfolge. Den Beginn bildete die olfaktorische Wiedererkennung. Durch verschiedene Versuchsaufbauten wurde das Wiedererkennungsgedächtnis zuerst bei direktem Kontakt und danach bei räumlicher Trennung von Jungtier und Versuchstier untersucht. Anschließend erfolgte die Analyse des Verhaltens der Mäuse im *Open Field*.

2.3.1 Versuche zur olfaktorischen Wiedererkennung

Hierfür wurden Mäuse der Stämme 129S1/SvImJ, Hyb1 und Hyb2 eingesetzt. Zwei Stunden vor jedem Experiment wurden die Mäuse in einem separaten Versuchsraum in frische Käfige mit den Abmaßen 14 x 20 x 15 cm gesetzt. Dieses Vorgehen diente dazu, Geruchsstimuli anderer Artgenossen zu minimieren und den Tieren ausreichend Zeit zur Habituation an die neue Umgebung zu geben.

Alle Wiedererkennungsversuche bestanden aus zwei Sessionen von je vier min. Dauer (Expositionszeit) und einem dazwischen liegenden 24 h Retentionsintervall. In der ersten Session wurde dem Versuchstier ein Jungtier präsentiert und das Verhalten des Versuchstieres gegenüber dem Juvenilen erfasst (*Sampling*). Dieses Jungtier wird im weiteren Text als ‚bekanntes Jungtier‘ bezeichnet. Die Zeit, die das adulte Tier ein Juveniles untersuchte, wird als **Investigationsdauer** bezeichnet. Dies umfasste Schnüffeln und Lecken am Jungtier. Zum **aggressiven/sexuellen Verhalten** gegenüber den Jungtieren zählten Beißen und Aufreiten. Während des anschließenden Retentionsintervalls befanden sich Versuchstier und Stimulustier in frischen, voneinander getrennten Versuchskäfigen. In der zweiten Session (*Choice*) wurden dem adulten Tier zum einen das bekannte Jungtier und zum anderen ein neues, unbekanntes Jungtier präsentiert. Damit der Beobachter die Jungtiere während des *Choice* unterscheiden konnte, erfolgte eine Schwanzmarkierung der Jungtiere (Edding 30 permanent Marker geruchsarm, grün oder rot, Edding AG, Deutschland). Der Einsatz dieser Markierungsart hatte in anderen Studien keinen Einfluss auf die Untersuchungszeit des adulten Tieres (Engelmann et al. 1995, Noack et al. 2010). Während beider Sessionen erfasste ein erfahrener Beobachter Investigations- und Aggressionsverhalten des adulten Tieres gegenüber den Juvenilen mit Hilfe des Computerprogramms *Eventlog Event Recorder (Version 1.0, Design: Robert Hendersen)*. Nach jedem Versuch wurden die Mäuse in ihre ursprünglichen Gruppen zurückgesetzt, um den Einfluss sozialer Isolation zu vermeiden und das Aggressionsverhalten so gering wie möglich zu halten (O'Donnell et al. 1981, Kogan et al. 2000).

Für die Beurteilung des Wiedererkennungsgedächtnisses wurde die Investigationsdauer während des *Choice* verwendet. Eine signifikant längere Investigationsdauer

des unbekanntes Jungtieres im Vergleich zum bekannten Jungtier wurde als Beweis für ein vorhandenes Wiedererkennungsgedächtnis gewertet (Dantzer et al. 1987, Engelmann et al. 1995, Richter et al. 2005, Noack et al. 2010, Engelmann et al. 2011).

Sozialer Diskriminationstest: *Sampling* direkte Exposition – *Choice* direkte Exposition

In diesem Wiedererkennungsversuch wurden sowohl beim *Sampling* als auch beim *Choice* die Jungtiere in den Käfig des Versuchstieres gegeben. Durch die fehlende räumliche Trennung war es der adulten Maus möglich, in beiden Sessionen den gesamten „olfaktorischen Fingerabdruck“ des Jungtieres zu erfassen. Der Versuch wurde mit allen Weibchen zweimal durchgeführt, um einen Vergleich des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses derselben Weibchen im Zyklusabschnitt des Proöstrus und im „Nicht-Proöstrus“ zu ermöglichen.

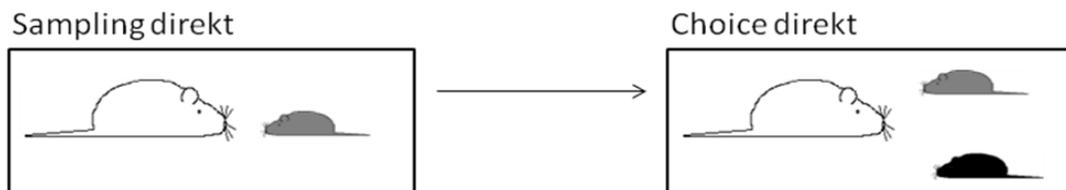


Abb. 4: *Sampling*: Jungtier (grau) befindet sich mit dem Versuchstier (weiß) im Versuchskäfig (direkte Exposition); *Choice*: aus dem *Sampling* bekanntes Jungtier (grau) und unbekanntes Jungtier (schwarz) befinden sich mit dem Versuchstier im Versuchskäfig (direkte Exposition).

„Lüfterkäfigtest“: *Sampling* indirekte Exposition – *Choice* direkte Exposition

In diesem Versuchsaufbau erfolgte das *Sampling* in einem speziell für diesen Versuch entwickelten „Lüfterkäfig“. Dieser bestand aus einem herkömmlichen Versuchskäfig mit den Abmaßen 20 x 37 x 15 cm. An einer Längsseite befanden sich zwei zylinderförmige Kammern mit einem Durchmesser von 7 cm. Hinter diesen Kammern war jeweils ein Lüfter installiert, der einen Luftstrom in Richtung des Käfigs erzeugte. Mit Hilfe eines Anemometers wurde eine Flussrate von 1 m/s im

Zentrum des Hohlzylinders gemessen (Almemo 2290-8, Ahlborn Mess- und Regeltechnik GmbH, Holzkirchen, Deutschland). Die räumliche Trennung der Kammern vom Käfiginneren erfolgte durch zwei engmaschige Drahtgitternetze. Der Abstand zwischen den Gittern betrug 4 cm. Außerdem bestand eine Trennung des Zylinderinnenraums vom Lüfter durch ein weiteres Gitternetz, welches in einen Schraubverschluss integriert war. Vermittels des Schraubverschlusses ließ sich die Kammer von hinten öffnen.

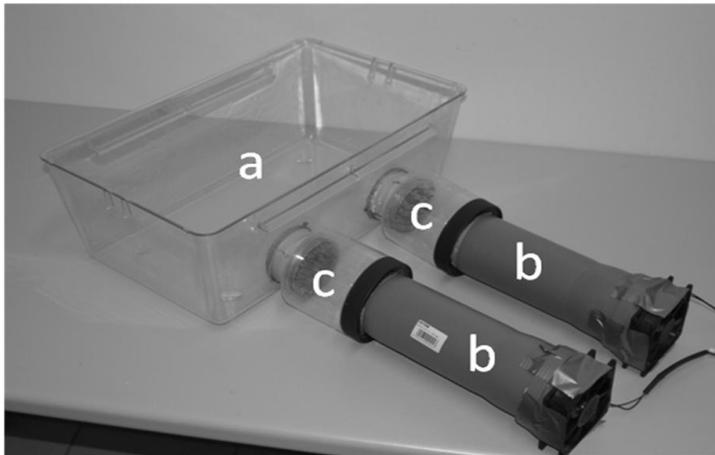


Abb. 5: „Lüfterkäfig“; a: Versuchskäfig; b: Lüfter, c: Kammern für Jungtiere (aus Noack et al. 2010).

Vor Beginn des *Samplings* wurde das Versuchstier für 10 min an den „Lüfterkäfig“ gewöhnt, ohne dass ein olfaktorischer Stimulus erfolgte. Anschließend wurde das Jungtier in eine der vorgeschriebenen Röhren gegeben und für 4 min. (EZ) ein Luftstrom erzeugt, der die volatilen Duftstoffe des Jungtieres in den Versuchskäfig transportierte. Zur Vermeidung einer Präferenzentwicklung der Tiere für einen bestimmten Hohlzylinder, wurde auf ein Alternieren der Expositionskammern geachtet. Schnüffelte das adulte Tier am Drahtnetz oder befand es sich in einem definierten Abstand (max. 22 cm) zu einer Kammer und schnüffelte erkennbar in Richtung des aus ihr stammenden Luftstroms, so wurde das als Interesse des adulten Tieres an dem in der Kammer befindlichen Jungtier gewertet. Aggressives Verhalten gegenüber dem Jungtier musste aufgrund des fehlenden Körperkontakts während des *Samplings* nicht dokumentiert werden.

Im *Choice* wurde das aus dem „Lüfterkäfig“ bekannte Juvenile gemeinsam mit einem unbekanntem Jungtier in den Käfig des Versuchstieres gegeben. Es war dem

adulten Tier dadurch möglich, den gesamten „olfaktorischen Fingerabdruck“ beider Juvenilen zu erfassen.



Abb. 6: *Sampling*: Versuchstier (weiß) und Jungtier (grau) sind räumlich voneinander getrennt im „Lüfterkäfig“ (indirekte Exposition); *Choice*: aus dem *Sampling* bekanntes Jungtier (grau) und unbekanntes Jungtier (schwarz) befinden sich mit dem Versuchstier im Versuchskäfig (direkte Exposition).

„Lüfterkäfigtest“: *Sampling* indirekte Exposition – *Choice* indirekte Exposition

Beide Sessions fanden bei diesem Versuch im „Lüfterkäfig“ statt. Das *Sampling* wurde wie im vorangegangenen Experiment durchgeführt. Im Rahmen des *Choice* erfolgte die Präsentation des bekannten und unbekanntes Jungtieres in je einer Kammer des „Lüfterkäfigs“. Die Verteilung der Juvenilen auf die Kammern alternierte. Die Erfassung der Investigationsdauer für beide Kammern erfolgte unter Berücksichtigung der definierten Kriterien.



Abb. 7 *Sampling*: Versuchstier (weiß) und Jungtier (grau) sind im „Lüfterkäfig“ räumlich voneinander getrennt (indirekte Exposition); *Choice*: aus dem *Sampling* bekanntes Jungtier (grau) und unbekanntes Jungtier (schwarz) sind im „Lüfterkäfig“ räumlich vom Versuchstier getrennt (indirekte Exposition).

2.3.2 Versuche im *Open Field*

Hierbei wurden neben den Versuchstieren, die bereits in den Versuchen der olfaktorischen Wiedererkennung verwendet wurden, weibliche und männliche Mäuse des Stammes C57BL/6J0laHsd eingesetzt. Alle *Open-Field*-Versuche erfolgten bei konstanter Helligkeit, Umgebungsgeräuschen und Temperatur. Das *Open Field* bestand aus einer 1 x 1 m großen weißen Polyacryl-Bodenplatte, die von 50 cm hohen Wänden aus demselben Material umgeben war. Das Versuchsfeld war in 20 Kästchen von je 10 x 10 cm unterteilt. Das Außenfeld bildeten die Kästchen mit direktem Kontakt zur Wand. Die übrigen Kästchen wurden als Innenfeld definiert. Das Versuchstier wurde ohne vorherige Isolation in eine definierte Ecke des Versuchsfeldes gegeben. Der Kopf des Tieres zeigte dabei in Richtung der Wand. Für die Erkundung des Versuchsfeldes wurden der Maus 10 min. gewährt. Die Aufzeichnung des Verhaltens fand mit Hilfe einer fest installierten Kamera statt. Nach Beendigung des Versuches wurde das Tier in die ursprüngliche Gruppe zurückgegeben und die Apparatur mit 30%igem Alkohol gereinigt. Die Auswertung der Videoaufzeichnungen erfolgte durch einen erfahrenen Beobachter unter Verwendung des Programms *Eventlog Event Recorder Version 1.0*. Erfasst wurden die überquerten Linien im Inneren sowie in den Außenanteilen des Feldes, die Aufenthaltsdauer im Innen- sowie im Außenfeld des Versuchsareals und das Verhalten des Tieres. Letzteres wurde unterteilt in Putz- und Erkundungsverhalten, Laufen sowie Aufrichten des Tieres. Als Erkundungsverhalten galt die Untersuchung der Umgebung durch Vorstrecken des Kopfes und der Vorderpfoten bei fixierten Hinterpfoten. Unter Laufverhalten wurde die horizontale Fortbewegung im *Open Field* erfasst, das heißt eine Ortsveränderung sowohl der Vorder- als auch der Hinterpfoten des Tieres. Des Weiteren wurde die Defäkationsmenge als Parameter für emotionalen „Stress“ gewertet. Dabei erfolgte eine Zählung der nach dem Versuch im *Open Field* vorhandenen Kotboli.

2.4 Statistische Auswertungen

Alle Varianzanalysen und post-hoc-Vergleiche wurden mit dem Programm GB-STAT 6.0 Dynamic Microsystems Inc. durchgeführt. Die t-Tests für gepaarte und ungepaarte Stichproben erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism4. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Signifikanz akzeptiert, wenn $p < 0,05$ war.

2.4.1 Statistische Auswertungen zur olfaktorischen Wiedererkennung

Berechnung des Recognition Index (RI)

Der Recognition Index (RI) stellt ein Maß für das Diskriminations-/ Wiedererkennungsvermögen eines Tieres dar. Er erlaubt einen relativen Vergleich der Wiedererkennung zwischen den einzelnen Genotypen und lässt sich aus der Investigationsdauer (t) beider Jungtiere (JT) während *Choice* berechnen:

$$RI = \frac{t(\text{unbekanntes JT})}{t(\text{unbekanntes JT}) + t(\text{bekanntes JT})} \times 100$$

Dabei gilt, dass bei einem RI von 50 die Untersuchung beider Jungtiere zufällig erfolgt. Ein RI über 50 spricht für eine längere Untersuchungszeit des unbekanntes Jungtieres. Liegt der RI unter 50 wurde das bekannte Jungtier länger erkundet.

Investigationsdauer und Aggressivität während des Samplings

Für jeden der drei Versuche wurde die Investigationsdauer während des *Samplings* als Maß für das Interesse des Versuchstieres am Jungtier mittels Zwei-Weg-ANOVA (Faktoren: Genotyp, Geschlecht) auf den Einfluss des Genotyps und des Versuchstiergeschlechts hin untersucht. Konnte ein signifikanter Einfluss der einzelnen Faktoren festgestellt werden, wurde der *Post-hoc-Test* nach Scheffé angeschlossen, um die Einflussnahme genauer zu charakterisieren. Im Falle eines signifikanten Einflusses des Faktors Geschlecht in der ANOVA wurde zusätzlich zur Unter-

suchung des Genotyp-übergreifenden Geschlechtseinflusses (Vergleich von Männchen und Weibchen miteinander unabhängig vom Genotyp) nur der Unterschied zwischen Männchen und Weibchen desselben Genotyps (Genotyp-spezifischer Geschlechtseinfluss) dargestellt und weiter diskutiert.

Das aggressive Verhalten der Versuchstiere gegenüber dem Jungtier wurde nur im ersten Versuch während des direkten *Samplings* mittels Zwei-Weg-ANOVA (Faktoren: Genotyp, Geschlecht) untersucht. Das Vorgehen entsprach dabei dem Verfahren bei der Analyse der Investigationsdauer. Die Betrachtung der Einflussnahme der Jungtierpräsentation während des *Samplings* auf die olfaktorische Wiedererkennung erfolgte mittels eines t-Tests für ungepaarte Stichproben. Aufgrund von multiplen Vergleichen ($n = 3$) wurde die Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni durchgeführt.

Investigationsdauer während des *Choice*

Zunächst erfolgte der Vergleich der Investigationsdauer des bekannten und des unbekanntes Jungtieres mittels eines t-Tests für gepaarte Stichproben. Dieser wurde getrennt nach Genotyp und Geschlecht des Versuchstieres durchgeführt. Als Voraussetzung galt das Vorliegen einer Normalverteilung, die mit dem Kolmogorov-Smirnow-Anpassungstest geprüft wurde. Anschließend wurde der Einfluss des Genotyps und des Geschlechts auf die Wiedererkennung mittels Zwei-Weg-ANOVA (Faktoren: Genotyp, Geschlecht) betrachtet. Dafür wurden die RI-Werte verwendet (Berechnung: siehe oben). Das weitere Vorgehen entsprach dem Verfahren bei der Betrachtung des Genotyp- und Geschlechtseinflusses auf die Investigationsdauer beim *Sampling*.

Darüber hinaus wurde die Gesamtinvestigationsdauer, welche sich aus der Summe der Investigationsdauer des bekannten und des unbekanntes Jungtieres ergab, mittels Zwei-Weg-ANOVA (Faktoren: Genotyp, Geschlecht) untersucht. Sie stellt ein Maß für das Interesse eines Tiers an der Untersuchung der Jungtiere während des *Choice* dar. Falls ein signifikanter Einfluss der Faktoren vorlag, wurde auch in diesem Fall der *Post-hoc*-Vergleich nach Scheffé angeschlossen. Auch hier wurden im Falle eines signifikanten Einflusses des Geschlechts in der ANOVA nur der Genotyp-übergreifende sowie der Genotyp-spezifische Geschlechtseinfluss dargestellt.

Einfluss des Jungtiergeschlechts und des weiblichen Zyklus auf die olfaktorische Wiedererkennung

Der Einfluss des Jungtiergeschlechts auf die Wiedererkennung wurde mittels Drei-Weg-ANOVA (Faktoren: Genotyp, Versuchstiergeschlecht, Jungtiergeschlecht) untersucht. Um die Bedeutung des weiblichen Zyklus für die olfaktorische Wiedererkennung zu prüfen, wurde bei den 23 Weibchen, die sich bei der zweimaligen Durchführung des Versuchs „*Sampling* direkt – *Choice* direkt“ einmal im Proöstrus und das andere Mal im „Nicht-Proöstrus“ befanden, die *Choice*-Investigationszeiten für das bekannte und das unbekannte Jungtier mittels des t-Tests für gepaarte Stichproben analysiert. Anschließend erfolgte der Vergleich der RIs derselben Weibchen (einmal im Proöstrus und einmal im „Nicht-Proöstrus“) ebenfalls mit Hilfe des t-Tests für gepaarte Stichproben. Zusätzlich wurde der Einfluss des weiblichen Zyklus anhand eines Zwei-Weg-ANOVA unter Verwendung der RIs (Faktoren: Versuch, Zyklus) Genotyp-übergreifend analysiert.

2.4.2 Statistische Auswertungen zum *Open-Field*-Versuch

Alle *Open-Field*-Parameter wurden mittels Zwei-Weg-ANOVA (Faktoren: Genotyp, Geschlecht) auf einen Einfluss des Genotyps oder Geschlechts des Versuchstieres hin untersucht. Im Falle eines signifikanten Einflusses des Faktors Geschlecht in der ANOVA wurden nur der Genotyp-übergreifende und der Genotyp-spezifische Geschlechtseinfluss dargestellt und weiter diskutiert. Anschließend wurde ein Ein-Weg-ANOVA (Faktor: Genotyp) mit *Post-hoc*-Vergleich nach Scheffé durchgeführt. Dabei wurde nicht nach männlichen und weiblichen Tieren getrennt betrachtet, um eine Charakterisierung der Genotypen zu erleichtern.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des *Open-Field*-Versuchs

3.1.1 Aufenthalt im *Open Field*

Wie unter 2.3.2 beschrieben, wurde das *Open Field* bei der Auswertung in einen Außenfeldbereich und einen Innenfeldbereich unterteilt. Bei der Analyse des Aufenthalts der Versuchstiere im Innenfeld mittels Zwei-Weg-ANOVA zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Faktors Genotyp sowie eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht (siehe Tab. 1 i.A.). Aufgrund des fehlenden Einflusses des Geschlechts und um eine präzisere Charakterisierung der Genotypen zu ermöglichen, wurde anschließend eine Ein-Weg-ANOVA (Faktor Genotyp) ohne Beachtung des Geschlechts der Versuchstiere durchgeführt. Wie in Abbildung 8 dargestellt, hielten sich die 129S1/SvImJ-Mäuse signifikant weniger im Innenfeld auf als die anderen drei Genotypen. Die Aufenthaltsdauer der Linie Hyb1 glich der von den C57BL/6J OlaHsd-Mäusen, die am längsten im Innenfeld beobachtet wurden. Die Hyb2-Tiere lagen mit ihrer Innenfeldaufenthaltsdauer zwischen den 129S1/SvImJ-Mäusen und der Linie Hyb1. Ein Genotyp-spezifischer Geschlechtseinfluss war nicht vorhanden (siehe Tab. 1 i.A.). Die Aufenthaltsdauer im Außenfeld entspricht reziprok dem Innenfeldaufenthalt (siehe Tab. 2 i.A.).

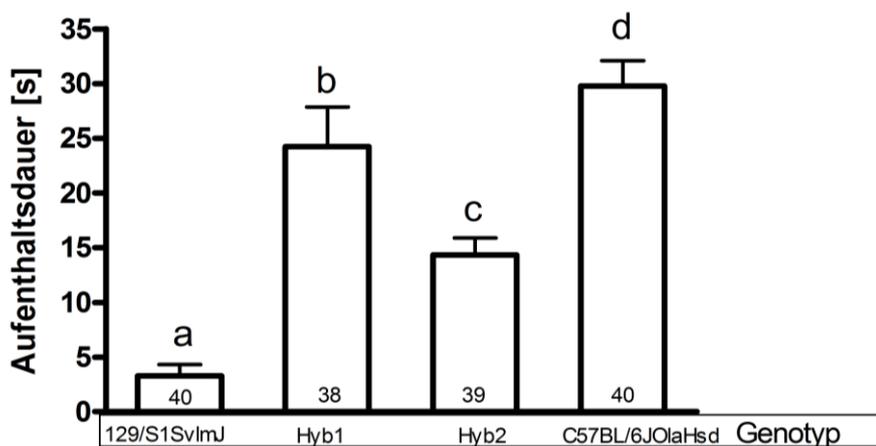


Abb. 8: Aufenthaltsdauer im Innenfeld des *Open Field* (Mittelwert und SEM): Dargestellt für vier Genotypen; a: $p < 0,01$ vs. b und d, $p < 0,05$ vs. c; b: $p < 0,05$ vs. c; c: $p < 0,01$ vs. d, Scheffé-Vergleich.

3.1.2 Überqueren von Linien

Die Anzahl der überquerten Linien kann als Maß für die horizontale Bewegung und damit der allgemeinen motorischen Aktivität der Tiere im *Open Field* gewertet werden. Bei der Betrachtung des Einflusses des Genotyps und des Geschlechts auf die Anzahl der überquerten Linien mittels Zwei-Weg-ANOVA zeigten sich ein signifikanter Effekt des Genotyps und eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht (siehe Tab. 3 i.A.). Wie in Abbildung 9 dargestellt, unterschieden sich in der Ein-Weg-ANOVA, welche den Einfluss des Genotyps ohne Beachtung des Geschlechts des Versuchstieres untersuchte, sowohl die 129S1/SvImJ- als auch die C57BL/6J0laHsd-Mäuse signifikant von den jeweils anderen Genotypen. Dabei überquerten die C57BL/6J0laHsd signifikant mehr Linien und die 129S1/SvImJ signifikant weniger Linien als die jeweils anderen Genotypen. Die gemessenen Werte der beiden hybriden Linien lagen zwischen denen der 129S1/SvImJ und der C57BL/6J0laHsd (siehe Tab. 3 i.A.). Ein Genotyp-spezifischer Geschlechtseinfluss konnte statistisch nicht nachgewiesen werden (siehe Tab. 3 i.A.).

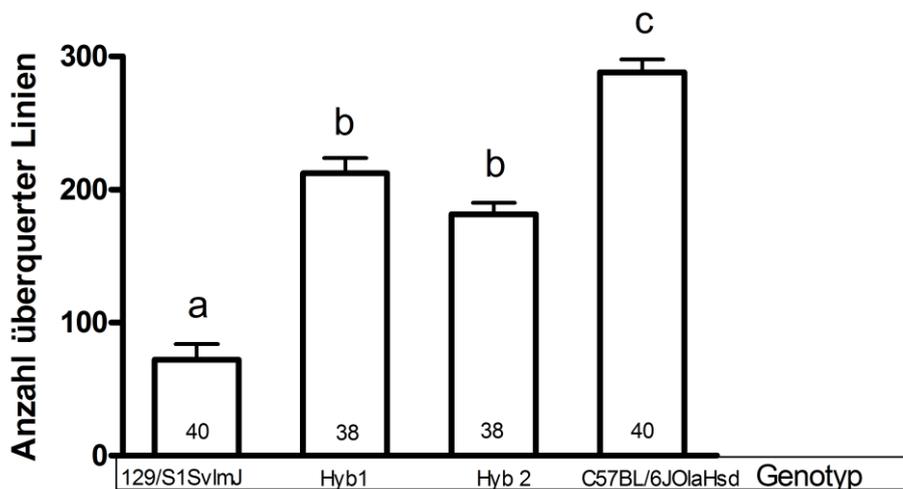


Abb. 9: Anzahl der überquerten Linien im *Open Field* (Mittelwert und SEM): Dargestellt für vier Genotypen. a: $p < 0,01$ vs. b und c; c: $p < 0,01$ vs. b, Scheffé- Vergleich.

3.1.3 Verhalten im *Open Field*

Wie unter 2.3.2 beschrieben, wurde das Lauf-, Erkundungs-, Aufricht- und Putzverhalten der Tiere im *Open Field* erfasst. Die beobachteten Verhaltensweisen zeigten einen Einfluss des Genotyps in der Zwei-Weg-ANOVA. Das Geschlecht der Tiere spielte nur bei dem Parameter Aufrichten eine Rolle (siehe Tab. 6 i.A.).

Laufen und Erkunden

In der Ein-Weg-ANOVA verbrachten die 129S1/SvImJ-Mäuse signifikant weniger Zeit mit Laufen und Erkunden als alle anderen Genotypen. Beim Parameter Laufen unterschieden sich auch die C57BL/6JolaHsd signifikant von den anderen Genotypen durch eine deutlich höhere Laufdauer. Die Laufdauer beider hybriden Linien lag statistisch zwischen den Werten der 129S1/SvImJ und der C57BL/6JolaHsd-Tiere (Abb. 10; siehe Tab. 4 i.A.). Bei der Erkundungsdauer glichen die hybriden Linien den C57BL/6JolaHsd-Mäusen (Abb. 11; siehe Tab. 5 i.A.). Ein Genotypspezifischer Geschlechtseinfluss zeigte sich nur bei der Laufdauer der 129S1/SvImJ-Tiere, wobei die Männchen eine längere Laufdauer aufwiesen (siehe Tab. 4 i.A.).

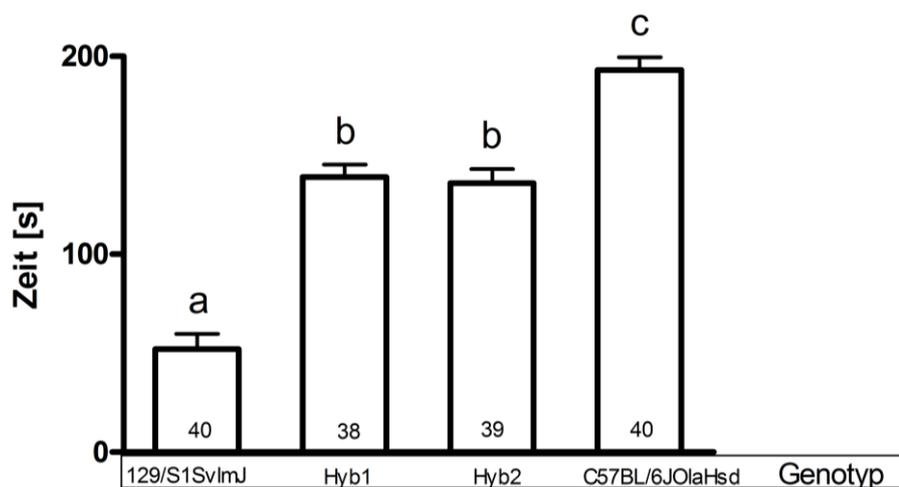


Abb. 10: Laufdauer im *Open Field* (Mittelwert und SEM): Dargestellt für vier Genotypen; a: $p < 0,01$ vs. b und c; b: $p < 0,01$ vs. c, Scheffé-Vergleich.

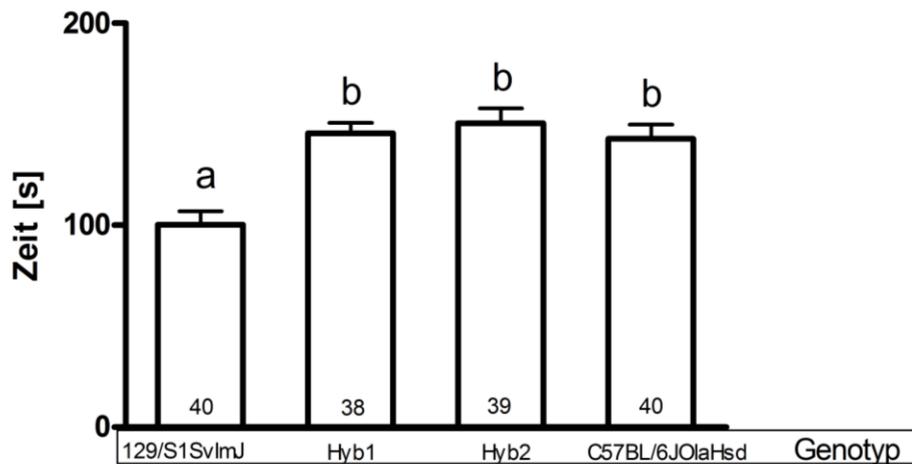


Abb. 11: Erkundungsdauer im *Open Field* (Mittelwert und SEM): Dargestellt für vier Genotypen; a: $p < 0,01$ vs. b, Scheffé-Vergleich.

Aufrichten

Genotyp-übergreifend richteten sich die weiblichen weniger lang als die männlichen Tiere auf (Zwei-Weg-ANOVA mit anschließendem Vergleich der Mittelwerte der Aufrichtungsdauer für Männchen und Weibchen). In der Ein-Weg-ANOVA unterschieden sich die 129S1/SvImJ-Mäuse durch eine verminderte Aufrichtungsdauer signifikant von den drei anderen Genotypen. Die C57BL/6JOlaHsd-Tiere verbrachten signifikant länger in aufgerichteter Position als die anderen Genotypen. Die Werte der hybriden Linien lagen zwischen denen der 129S1/SvImJ- und der C57BL/6JOlaHsd-Mäuse (Abb. 12; siehe Tab. 6 i.A.).

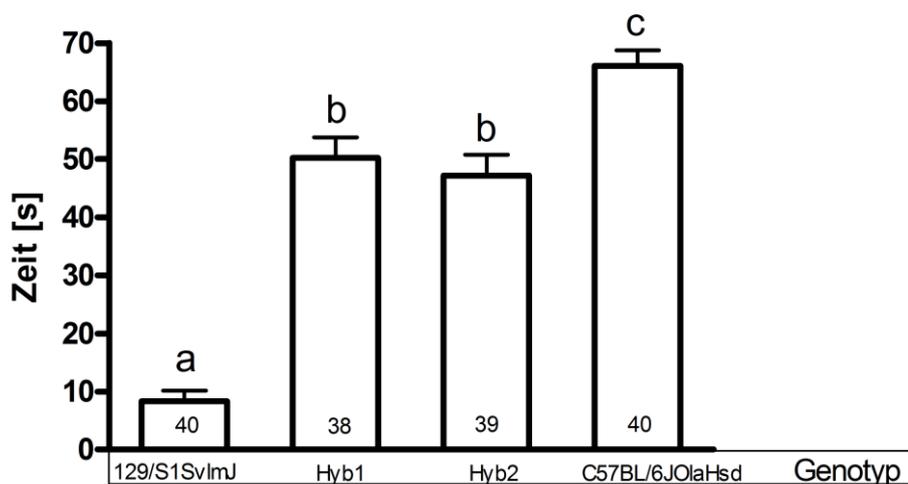


Abb. 12: Dauer, welche die Tiere aufgerichtet im *Open Field* verbrachten (Mittelwert und SEM): Dargestellt für vier Genotypen; a: $p < 0,01$ vs. b und c; b: $p < 0,01$ vs. c, Scheffé- Vergleich.

Putzen

In der Ein-Weg-ANOVA zeigte die Linie Hyb2 im Vergleich mit den 129S1/SvImJ- und den C57BL/6J OlaHsd-Mäusen eine signifikant verlängerte Putzdauer, wobei sie sich von der Hyb1-Linie nicht signifikant unterschied. Die Hyb1-Linie lag in ihrer Putzdauer zwischen den Hyb2-Tieren und den C57BL/6J OlaHsd-Mäusen; von beiden Gruppen unterschieden sie sich nicht signifikant. Einen signifikanten Unterschied ergab jedoch der Vergleich zwischen der Hyb1-Linie und den 129S1/SvImJ-Mäusen. Die C57BL/6J OlaHsd-Tiere und die 129S1/SvImJ wiederum putzten sich vergleichbar lang (Abb. 13; siehe Tab. 7 i.A.). Es lag kein Genotyp-spezifischer Geschlechtseinfluss vor (siehe Tab. 7 i.A.).

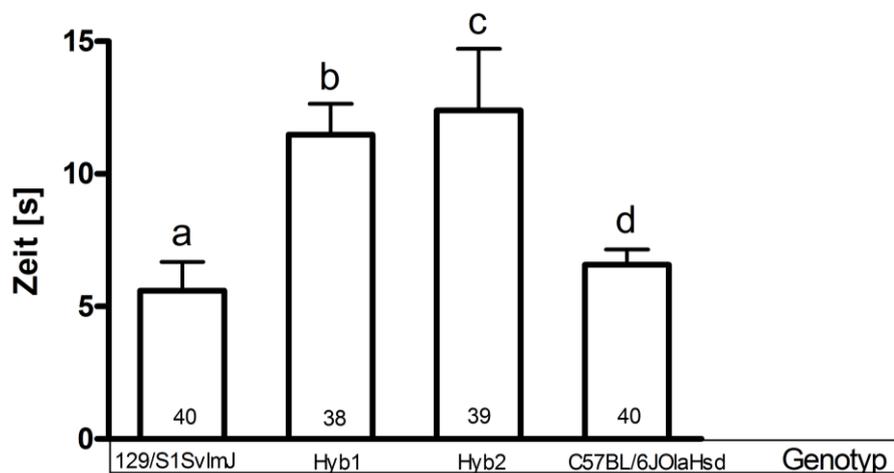


Abb. 13: Putzdauer im *Open Field* (Mittelwert und SEM): Dargestellt für vier Genotypen; a: $p < 0,05$ vs. b und c; d: $p < 0,05$ vs. c, Scheffé-Vergleich.

3.1.4 Defäkation

Mittels Zwei-Weg-ANOVA konnte sowohl ein Einfluss des Genotyps als auch des Geschlechts auf die Anzahl der Kotboli festgestellt werden. Die männlichen Tiere hinterließen deutlich mehr Kotboli als die Weibchen im *Open Field*. Es bestand kein Genotyp-spezifischer Geschlechtseinfluss (siehe Tab. 8 i.A.). Wie in Abbildung 14 dargestellt, zeigte sich in der Ein-Weg-ANOVA, dass die C57BL/6JOlaHsd-Mäuse signifikant weniger Kotboli absetzten als die anderen Genotypen.

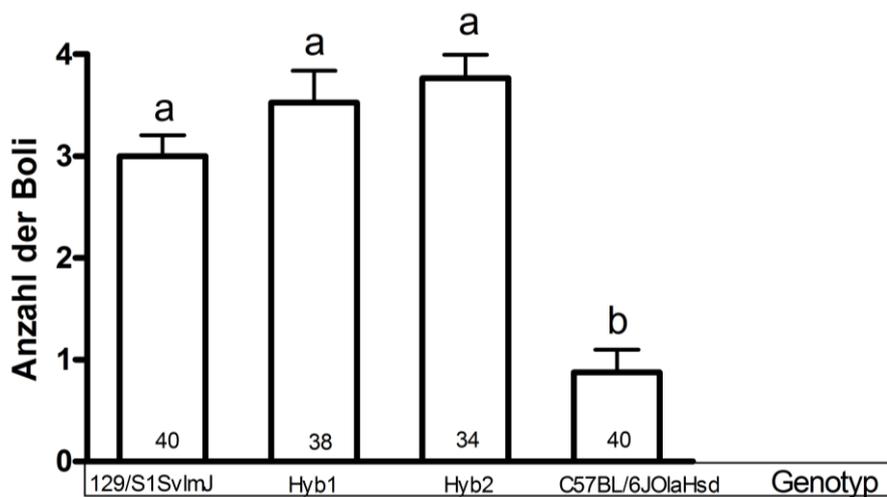


Abb. 14: Anzahl an Kotboli im *Open Field* (Mittelwert und SEM): Dargestellt für vier Genotypen; a: $p < 0,01$ vs. b, Scheffé-Vergleich.

3.2 Ergebnisse zur olfaktorischen Wiedererkennung

Die Darstellung der Ergebnisse in diesem Kapitel erfolgt getrennt nach den drei durchgeführten experimentellen Ansätzen zur olfaktorischen Wiedererkennung. Dabei wird zuerst die Investigationsdauer während des *Samplings* als Maß für das Interesse des Versuchstieres an einem Jungtier dargestellt. Anschließend wird die Investigationsdauer für das bekannte mit der für das unbekannte Jungtier während des *Choice*‘ verglichen. Abschließend erfolgt die Untersuchung weiterer Einflussfaktoren wie der Art der Jungtierpräsentation, des Jungtiergeschlechts und des weiblichen Zyklus.

3.2.1 Der soziale Diskriminationstest: *Sampling* direkte Exposition – *Choice* direkte Exposition

Investigationsdauer während des *Samplings*

Abbildung 15 zeigt die unterschiedliche Investigationsdauer der drei Genotypen im Vergleich. Die Frage nach einem möglichen Einfluss des Genotyps und des Geschlechts auf diesen Parameter während des *Samplings* wurde mittels Zwei-Weg-ANOVA gestellt und ergab für diesen Versuch einen signifikanten Effekt beider Faktoren (siehe Tab. 9 i.A.). Um diesen Einfluss genauer zu beleuchten, wurde der *Post-hoc*-Test nach Scheffé durchgeführt. Er erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen der Hyb2-Linie und den beiden anderen Genotypen (siehe Tab. 9 i.A.). Die Genotyp-übergreifende Bedeutung des Geschlechts des Versuchstieres spiegelte sich in einer signifikant längeren Investigationsdauer der Männchen wider. Ein Genotyp-spezifischer Geschlechtseinfluss zeigte sich jedoch nur bei der Linie Hyb2. Die männlichen Tiere untersuchten das Jungtier signifikant länger als die Weibchen (siehe Tab. 9 i.A.).

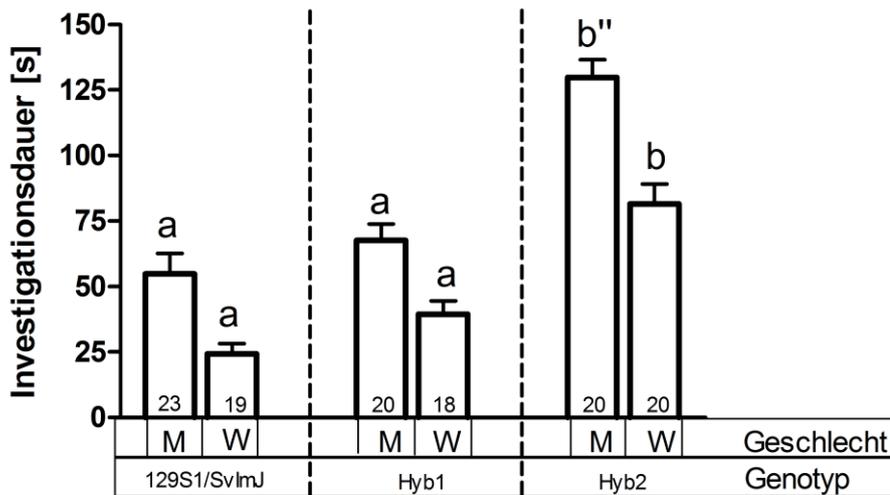


Abb. 15: Investigationsdauer (Mittelwert und SEM) während des *Samplings*: Dargestellt für drei Genotypen und jeweils beide Geschlechter (M = Männchen, W = Weibchen). Versuch: *Sampling* direkt – *Choice* direkt; Scheffé-Vergleich für b, b'': $p < 0,01$ vs. a; b: $p < 0,01$ vs. b'').

Investigationsdauer während des *Choice*'

Sowohl die männlichen als auch die weiblichen Tiere aller drei Genotypen zeigten eine signifikant verringerte Investigationsdauer des bekannten Jungtieres verglichen mit der des unbekanntes Jungtieres (Abb. 16).

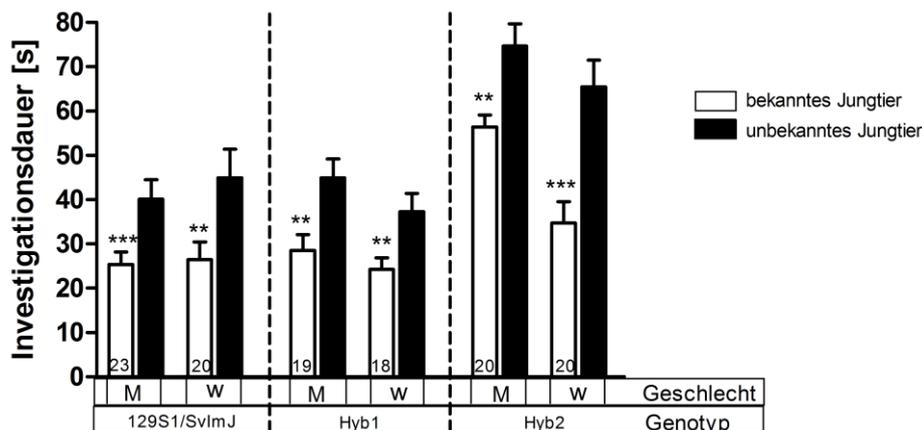


Abb. 16: Investigationsdauer (Mittelwert und SEM) des unbekanntes und des bekannten Jungtieres während des *Choice*': Dargestellt für 3 Genotypen und jeweils beide Geschlechter (M = Männchen, W = Weibchen). Versuch: direktes *Sampling* - direktes *Choice*; t-Test für gepaarte Stichproben, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Wie auch beim *Sampling* unterschieden sich die Genotypen hinsichtlich der Gesamtinvestigationsdauer. Diese ergab sich aus der Summation der Investigations-

dauer des bekannten und des unbekanntes Jungtieres und stellt ein Maß für das generelle Interesse des Versuchstieres an der Untersuchung der Jungtiere während des *Choice* dar. Mittels Zwei-Weg-ANOVA konnte ein signifikanter Einfluss des Genotyps, des Geschlechts und eine signifikante Interaktion beider Faktoren auf die Gesamtinvestigationsdauer nachgewiesen werden (Werte i.A. in Tab. 10). Der *Post-hoc*-Vergleich nach Scheffé erbrachte, dass die männlichen Hyb2-Mäuse die Jungtiere deutlich länger untersuchten als die anderen beiden Genotypen. Bei den Weibchen bestand nur ein Unterschied zwischen den hybriden Linien, wobei die Hyb2-Tiere die Juvenilen länger erkundeten als die Hyb1-Mäuse. Genotypübergreifend zeigte sich ein Einfluss des Geschlechts durch das größere Interesse der Männchen an den Juvenilen verglichen mit den Weibchen.

Um einen Genotyp-übergreifenden Vergleich des relativen Wiedererkennungsvermögens zu ermöglichen, wurde der RI verwendet (siehe 2.4.1). Mit Hilfe des RI wurde im Zwei-Weg-ANOVA der Einfluss des Genotyps und des Geschlechts auf die Wiedererkennung untersucht. Es konnte für keinen der Faktoren ein signifikanter Effekt auf die olfaktorische Wiedererkennung nachgewiesen werden (ANOVA-Werte: siehe Tab. 11 i.A.).

Aggressivität gegenüber den Jungtieren

Die Analyse des aggressiven Verhaltens gegenüber den Juvenilen erfolgte während des direkten *Samplings* im ersten Versuch (*Sampling* direkt – *Choice* direkt). Die Untersuchung des Einflusses des Genotyps und des Geschlechts auf das aggressive Verhalten mittels Zwei-Weg-ANOVA ergab einen signifikanten Effekt für den Genotyp und eine signifikante Interaktion zwischen beiden Faktoren (siehe Tab. 12 i.A.). Der *Post-hoc*-Vergleich nach Scheffé erbrachte nur bei den weiblichen Tieren einen signifikanten Einfluss des Genotyps. Wie in Abbildung 17 dargestellt, waren die Weibchen der Linie Hyb2 deutlich aggressiver als die Weibchen der anderen beiden Genotypen (siehe Tab. 12 i.A.). Ein Genotyp-spezifischer Geschlechtseinfluss konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Tab. 12 i.A.).

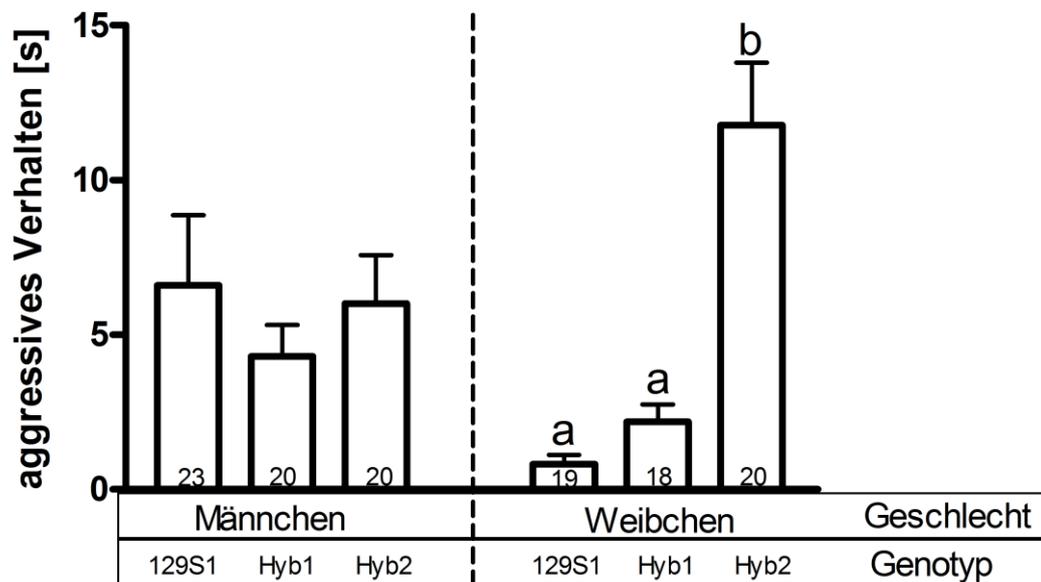


Abb. 17: Dauer des aggressiven Verhaltens (Mittelwert und SEM) gegenüber dem Juvenilen während des direkten *Samplings*: Dargestellt für drei Genotypen und jeweils beide Geschlechter (a: $p < 0,01$ vs. b, Scheffé-Vergleich).

Wie in Abbildung 18 dargestellt, konnte bei den weiblichen Versuchstieren eine signifikante Abhängigkeit der Aggressivität vom Jungtiergeschlecht statistisch nachgewiesen werden: gegenüber weiblichen waren sie signifikant aggressiver als gegenüber männlichen Juvenilen (t-Test, $p < 0,01$). Bei den männlichen Adulten ließ sich diese Abhängigkeit nicht nachweisen.

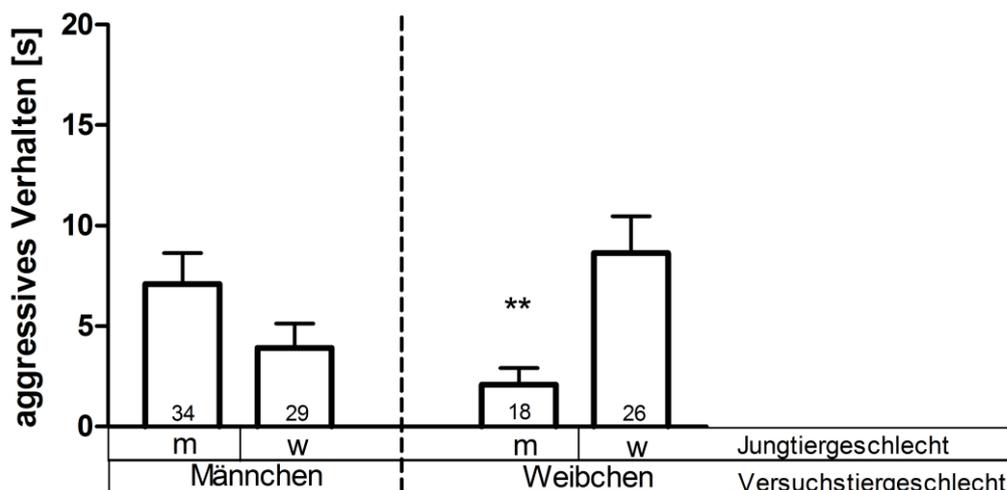


Abb. 18: Abhängigkeit der Dauer der Aggressivität von männlichen und weiblichen Versuchstieren vom Geschlecht des Jungtieres (JT) (Mittelwert und SEM); t-Test für gepaarte Stichproben $**p < 0,01$.

3.2.2 „Lüfterkäfigtest“: *Sampling* indirekte Exposition – *Choice* direkte Exposition

Investigationsdauer während des *Samplings*

In Abbildung 19 ist die Investigationsdauer der einzelnen Genotypen abgebildet. Die Betrachtung des Einflusses von Genotyp und Geschlecht auf die Investigationsdauer während des *Samplings* mittels Zwei-Weg-ANOVA ergab für diesen Versuch nur einen nachweisbaren Effekt für den Faktor Genotyp (siehe Tab. 13 i.A.). Der *Post-hoc*-Vergleich der Genotypen nach Scheffé erbrachte eine signifikant unterschiedliche Investigationsdauer der Hyb2-Linie verglichen mit den anderen beiden Genotypen (siehe Tab. 13 i.A.).

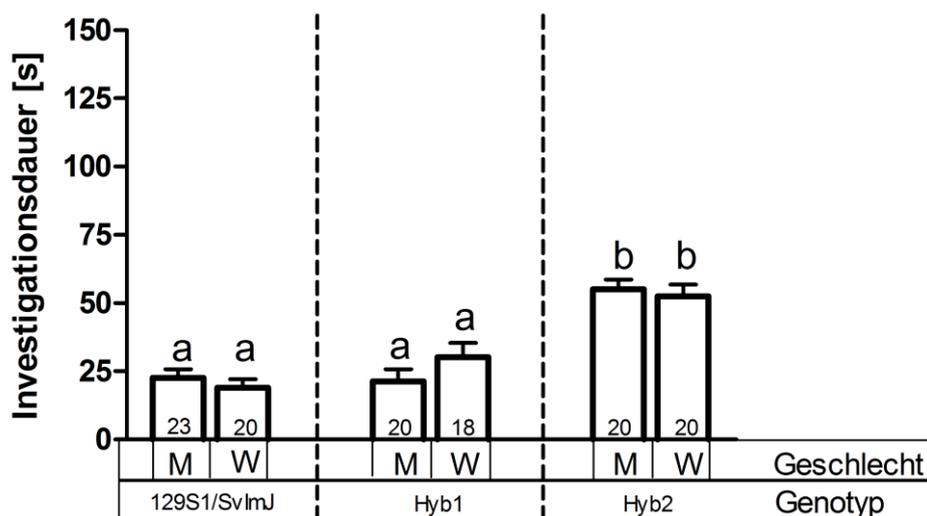


Abb. 19: Investigationsdauer (Mittelwert und SEM) während des *Samplings*: Dargestellt für drei Genotypen und jeweils beide Geschlechter (M = Männchen, W = Weibchen). Versuch: *Sampling* indirekt – *Choice* direkt; (a: $p < 0,01$ vs. b, Scheffé-Vergleich).

Investigationsdauer während des *Choice*

Wie in Abbildung 20 dargestellt, ergab der Vergleich der Investigationsdauer während des *Choice*, dass die 129S1/SvImJ-Mäuse, die Hyb2-Linie sowie die Männchen der Hyb1-Linie das bekannte Jungtier signifikant kürzer untersuchten. Für die Weibchen der Hyb1-Linie waren keine Unterschiede in den Untersuchungszeiten der beiden Jungtiere statistisch nachweisbar.

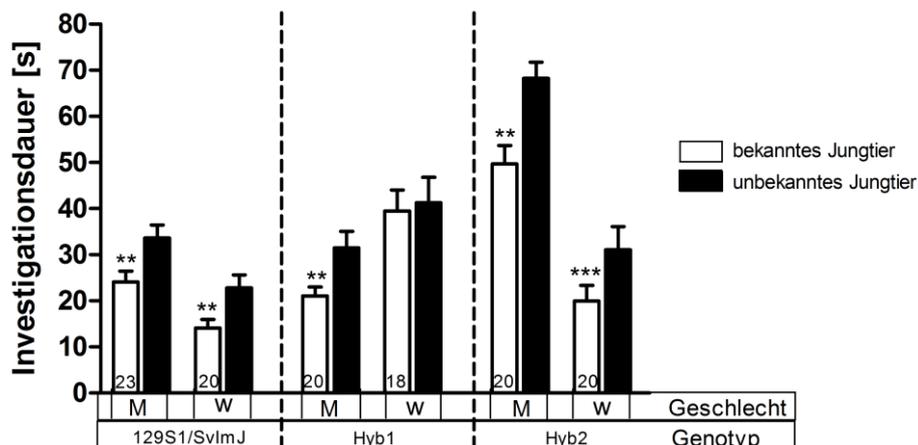


Abb. 20: Investigationsdauer (Mittelwert und SEM) während des *Choice*: Dargestellt für drei Genotypen und jeweils beide Geschlechter (M = Männchen, W = Weibchen). Versuch: indirektes *Sampling* - direktes *Choice*; t-Test für gepaarte Stichproben, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Wie auch beim *Sampling* zeigte sich ein Unterschied in der Gesamtinvestigationsdauer während des *Choice* zwischen den Genotypen. Mittels Zwei-Weg-ANOVA konnte ein signifikanter Einfluss von Genotyp, Geschlecht und eine signifikante Interaktion beider Faktoren nachgewiesen werden (siehe Tab. 14 i.A.). Der *Post-hoc*-Vergleich nach Scheffé ergab, dass die Hyb2-Männchen eine signifikant längere Investigationsdauer aufwiesen als die beiden anderen Genotypen. Bei den Weibchen untersuchten die Hyb1-Tiere die Juvenilen länger als die Hyb2- und die 129S1/SvImJ-Mäuse. Insgesamt erkundeten die Männchen die Jungtiere länger als die weiblichen Versuchstiere.

Die Untersuchung der Abhängigkeit der olfaktorischen Wiedererkennung von Genotyp und Geschlecht mittels Zwei-Weg-ANOVA ergab für beide Faktoren keinen signifikanten Effekt. Die Interaktion der Faktoren war jedoch signifikant (siehe Tab. 15 i.A.). Im *Post-hoc*-Vergleich nach Scheffé ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen darstellen (siehe Tab. 15 i.A.). Ein Genotyp-spezifischer Geschlechtseinfluss lag nicht vor (siehe Tab. 15 i.A.).

3.2.3 „Lüfterkäfigtest“: *Sampling* indirekte Exposition – *Choice* indirekte Exposition

Investigationsdauer während des *Samplings*

Wie in Abbildung 21 dargestellt, ließ die Betrachtung des Einflusses von Genotyp und Geschlecht mittels Zwei-Weg-ANOVA nur einen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp erkennen (siehe Tab. 16 i.A.). Der *Post-hoc*-Vergleich nach Scheffé zeigte, dass beide hybriden Linien den Luftstrom mit dem Duft des Jungtiers signifikant länger untersuchten als die 129S1/SvImJ-Mäuse (siehe Tab. 16 i.A.).

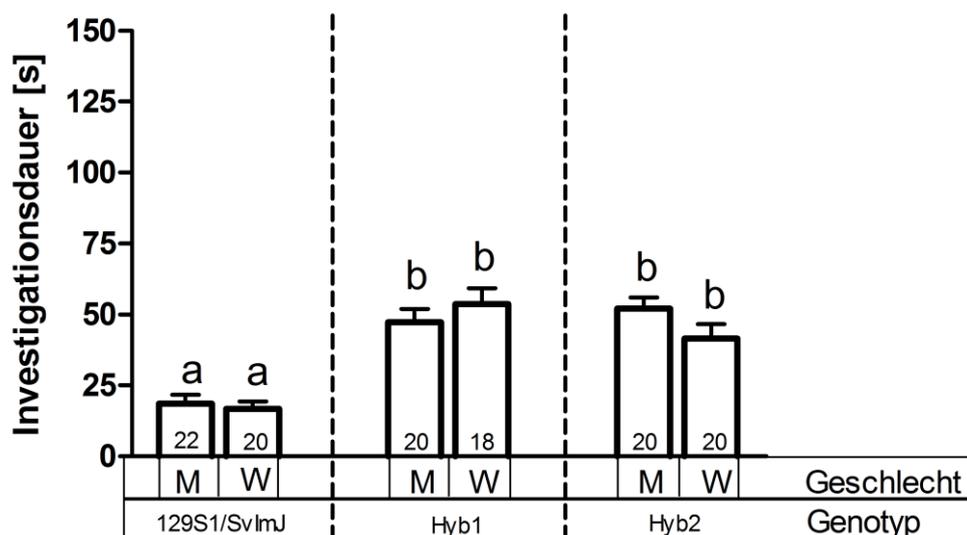


Abb. 21: Investigationsdauer (Mittelwert und SEM) während des *Samplings* im Lüfterkäfig: Dargestellt für drei Genotypen und jeweils beide Geschlechter (M = Männchen, W = Weibchen). Versuch: *Sampling* indirekt – *Choice* indirekt; (a: $p < 0,01$ vs. b, Scheffé-Vergleich).

Investigationsdauer während des *Choice*

Wie in Abbildung 22 dargestellt, ergab der Vergleich der Investigationsdauer während des *Choice* nur für die Männchen der Genotypen 129S1/SvImJ und Hyb1 eine signifikant kürzere Investigationsdauer des Luftstroms mit dem Duft des bekannten Jungtieres. Alle weiblichen Versuchstiere und die männlichen Hyb2-Mäuse zeigten keinen Unterschied in der Investigation der beiden Luftströme.

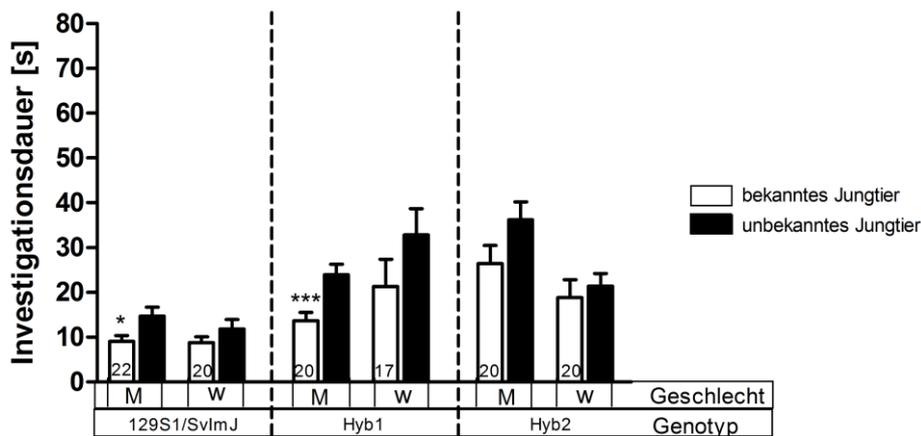


Abb. 22: Investigationsdauer (Mittelwert und SEM) während des *Choice*: Dargestellt für drei Genotypen und jeweils beide Geschlechter (Männchen = M, Weibchen = W).]; Versuch: indirektes *Sampling* - indirektes *Choice*; t-Test für gepaarte Stichproben, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Der Vergleich der Gesamtinvestigationsdauer während des *Choice* mittels Zwei-Weg-ANOVA ergab einen signifikanten Einfluss des Faktors Genotyp sowie eine signifikante Interaktion von Genotyp und Geschlecht (siehe Tab. 17 i.A.). Im *Post-hoc*-Vergleich nach Scheffé zeigte sich, dass die Männchen der Linie Hyb2 die Jungtiere länger untersuchten als die beiden anderen Genotypen. Bei den Weibchen erwiesen sich die Hyb1-Tiere interessierter an den Jungtieren als die 129S1/SvImJ-Weibchen. Die Hyb2-Weibchen unterschieden sich nicht signifikant von den anderen Genotypen. Ein Genotyp-spezifischer Geschlechtseinfluss konnte nur bei der Linie Hyb2 nachgewiesen werden, wobei die Männchen eine längere Gesamtinvestigationsdauer als die Weibchen aufweisen (siehe Tab. 17 i.A.).

Die Untersuchung der Abhängigkeit der olfaktorischen Wiedererkennung von Genotyp und Geschlecht mittels Zwei-Weg-ANOVA erbrachte keine signifikanten Unterschiede in diesem Versuch (siehe Tab. 18 i.A.).

3.2.4 Einfluss der Art der Jungtierpräsentation auf die *Sampling*-Investigationsdauer

Die unterschiedliche Präsentationsweise des Stimulustieres während des *Samplings* spiegelte sich in der Investigationsdauer der adulten Tiere wider. Wie in Abbildung 23 dargestellt, provozierte der direkte Kontakt zum Jungtier eine signifikant längere Investigationsdauer gegenüber der Präsentation des Luftstroms, der ausschließlich die volatilen Anteile des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ enthielt.

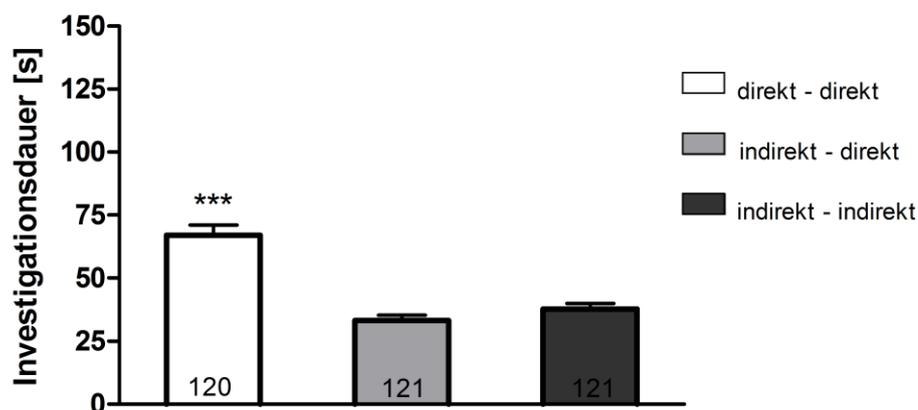


Abb. 23: Investigationsdauer aller Versuchstiere (129S1/SvImJ, Hyb1, Hyb2) während des *Samplings* (Mittelwert und SEM): Dargestellt für drei Versuche der olfaktorischen Wiedererkennung: 1. *Sampling* direkt – *Choice* direkt (direkt – direkt), 2. *Sampling* indirekt – *Choice* direkt (indirekt – direkt), 3. *Sampling* indirekt – *Choice* indirekt (indirekt – indirekt); multipler t-Test für ungepaarte Stichproben mit Korrektur nach Bonferroni, $\alpha' = \alpha/n$, bei $\alpha = 0,05$ und drei Vergleichen ($n = 3$), $\alpha' = 0,017$; *** $p < 0,001$ gegen alle anderen Expositionsmodi.

3.2.5 Einfluss des Jungtiergeschlechts auf die Wiedererkennung

Der Einfluss des Jungtiergeschlechts auf die Wiedererkennung wurde unter Verwendung des RI für alle drei Versuche untersucht. Es konnte mittels Drei-Weg-ANOVA weder für den Faktor Jungtiergeschlecht noch für die Interaktion des Jungtiergeschlechts mit dem Genotyp oder dem Versuchstiergeschlecht ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden (siehe Tab. 19 i.A.).

3.2.6 Einfluss des weiblichen Zyklus auf die Wiedererkennung

Für die Analyse des Einflusses des weiblichen Zyklus auf das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis wurde die olfaktorische Wiedererkennungsfähigkeit von 23 Weibchen (Genotyp 129S1/SvImJ, Hyb1, Hyb2) zweimal im Versuch *Sampling* direkt – *Choice* direkt untersucht. Die Weibchen befanden sich dabei in einem Versuch im Proöstrus, im anderen Versuch hingegen im „Nicht-Proöstrus“. Wie in Abbildung 24 dargestellt, zeigten die Weibchen sowohl im Proöstrus als auch im „Nicht-Proöstrus“ eine signifikant kürzere Investigationsdauer des bekannten Jungtieres während *Choice*. Ein Vergleich der RIs der Weibchen im Proöstrus mit den RIs im „Nicht-Proöstrus“ mittels gepaartem t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied der RIs in beiden Zyklusstadien ($p = 0,3518$).

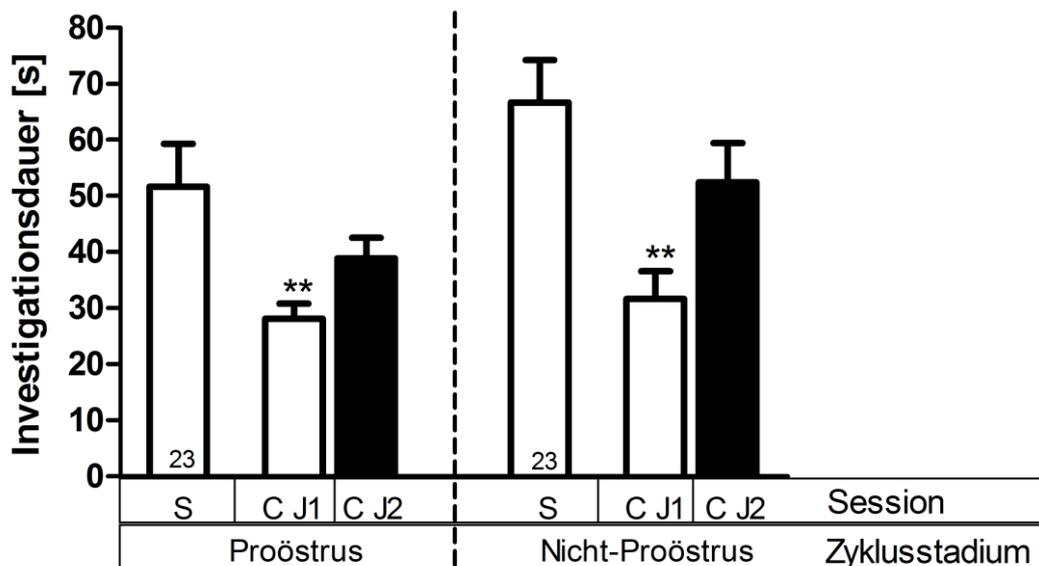


Abb. 24: Investigationsdauer weiblicher Versuchstiere während unterschiedlicher Zyklusabschnitte im Versuch *Sampling* direkt – *Choice* direkt: Dargestellt für zwei Zyklusabschnitte und zwei Sessionen. Zyklusabschnitte: Proöstrus, „Nicht-Proöstrus“; Sessionen: *Sampling* (S), *Choice* (C). Sowohl Weibchen im Proöstrus als auch im „Nicht-Proöstrus“ untersuchten das bekannte Jungtier (J1) signifikant kürzer als das unbekannte Jungtier (J2). Die *Sampling*-Investigationsdauer während des Proöstrus unterschied sich nicht signifikant von der während des „Nicht-Proöstrus“. t-Test für gepaarte Stichproben, ** $p < 0,01$.

Auch mittels Zwei-Weg-ANOVA unter Verwendung der RI-Werte der Weibchen aller drei Versuche zur olfaktorischen Wiedererkennung konnte kein Einfluss der definierten Zyklusabschnitte auf die olfaktorische Wiedererkennung gezeigt werden (siehe Tab. 20 i.A.).

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das olfaktorische Wiedererkennungs-gedächtnis bei Mäusen des Stammes 129S1/SvImJ sowie zweier hybrider Linien, welche durch die Kreuzung der Stämme 129S1/SvImJ und C57BL/6J0laHsd entstanden, untersucht werden. Dabei wurde die Bedeutung des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“ sowie nur seines volatilen Anteils für das Wiedererkennen von Artgenossen unter Verwendung des sozialen Diskriminationstests sowie dessen Modifikation, dem „Lüfterkäfigtest“, analysiert. Durch den Einsatz von männlichen und weiblichen Versuchstieren sollte zudem überprüft werden, ob das Geschlecht des Versuchstieres und/oder der weibliche Zyklus einen Einfluss auf die olfaktorische Wiedererkennung haben.

Der zusätzlich durchgeführte *Open-Field*-Versuch diente der Erfassung von weiteren Parametern, die mögliche Auswirkungen auf die Investigationsdauer in den oben genannten olfaktorischen Wiedererkennungstests haben könnten. Dazu gehören das angeständliche Verhalten und die motorische Aktivität der Tiere.

4.1 Grenzen des experimentellen Ansatzes

Mögliche Fehlerquellen im Rahmen des sozialen Diskriminationstests, einschließlich des „Lüfterkäfigtests“, sind vor allem ein nicht konsequentes Einhalten der Bewertungskriterien bei der Erfassung des Versuchstierverhaltens durch den Beobachter und das Vorhandensein von Störgrößen bei der Versuchsdurchführung.

Tatsächlich führt bei der Erfassung des Versuchstierverhaltens sowohl im sozialen Diskriminations- als auch im „Lüfterkäfigtest“ die menschliche Reaktionszeit zu Verzögerungen in der Registrierung des Beginns und des Beendens von investigativem oder aggressivem Verhalten der Versuchstiere. Darüber hinaus obliegt die Bewertung der Qualität des Verhaltens, ob investigativ, aggressiv oder sexuell, allein dem Beobachter. Durch unzureichende Sicht oder Missinterpretation des Verhaltens können auch in diesem Zusammenhang Fehler entstehen. Um sie zu vermeiden, sind eine genaue Definition der einzelnen Verhaltensweisen des Tieres

sowie eine Optimierung der Sichtverhältnisse essentiell. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die gewählten Verhaltensparameter gut beurteilbar waren und das Verhalten somit sicher charakterisiert werden konnte. Dafür sprechen die gemessenen Untersuchungszeiten und die RIs, die – zumindest bei der direkten Exposition in *Sampling* und *Choice* – vergleichbare Werte zwischen den Stämmen und Hybridlinien erzielten. Zwar setzt die hier vorgenommene Analyse einen erfahrenen Beobachter voraus, doch wird so das Verhalten der Tiere im Test *direkt* und *umfassend* erfasst. Verhaltensauffälligkeiten (z.B. verstärktes Putzen, lokomotorische Anomalien) werden zwar nicht direkt als Parameter aufgezeichnet, fallen aber dem geübten Beobachter sofort ins Auge. Das ist insbesondere bei Experimenten mit pharmakologischen Behandlungen von Vorteil, gegenüber solchen Testsystemen, die nach dem Prinzip einer „Black-Box“ nur ausgewählte motorische Reaktionen der Versuchstiere detektieren und bei denen wichtige andere Verhaltensparameter „im Dunkeln“ bleiben.

Bei der Durchführung der Versuche mit direkter Jungtierpräsentation im *Choice* kann das Verhalten der Stimulustiere das Versuchsergebnis dahingehend beeinflussen, dass ein investigatives oder aggressives Verhalten des Versuchstiers gefördert oder gehemmt wird. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die lange Expositionszeit von vier Minuten sowie die Anzahl von 20 Tieren pro Versuchsgruppe einen Einfluss des Stimulustierverhaltens vernachlässigbar gering werden lassen.

Es ist anzunehmen, dass bei der Untersuchung des Langzeitgedächtnisses mit Hilfe des sozialen Diskriminationstests und des „Lüfterkäfigtests“ nicht ausschließlich das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis der Mäuse geprüft wird. Zusätzlich zu den olfaktorischen Stimuli nimmt das Versuchstier während beider Sessionen auch taktile, visuelle und akustische Reize des Jungtieres auf. Diese Stimuli sind jedoch wichtig, um eine normale soziale Interaktion zwischen Versuchstier und Stimulustier zu ermöglichen und somit überhaupt von einer *sozialen* Diskrimination sprechen zu können. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Wiedererkennung eines Artgenossen bei Nagern, als Makrosmaten, hauptsächlich olfaktorisch erfolgt (Matochik 1988, Bluthé und Dantzer 1993) und der Einfluss der anderen Modalitäten für das Wiedererkennen von Artgenossen von untergeordneter Bedeutung ist.

Darüber hinaus ist kritisch zu betrachten, dass es nur wenige Referenzdaten zum Langzeitgedächtnis weiblicher Tiere gibt. Kogan und Mitarbeiter (2000) konnten zwar zeigen, dass in Gruppen gehaltene Männchen ein Langzeitgedächtnis von sieben Tagen aufwiesen, ob dies ebenfalls für weibliche Mäuse gilt, wurde jedoch nicht untersucht. Auch die Frage, welche Gruppengröße bei der Haltung der Weibchen die optimale Voraussetzung für die soziale Wiedererkennung bietet, wurde bislang noch nicht beantwortet.

4.2 Der *Open-Field*-Versuch

Der *Open-Field*-Versuch ist ein einfaches und häufig genutztes Verfahren, um die motorische Aktivität sowie die Emotionalität bzw. das angstähnliche Verhalten von Mäusen zu untersuchen. Die überquerten Linien lassen hierbei auf die zurückgelegte Strecke schließen und erlauben so eine Aussage über die motorische Aktivität des Tieres. Für die Messung des angstähnlichen Verhaltens der Versuchstiere gibt es im *Open Field* jedoch keinen einzelnen Parameter (Crawley 1996). Rückschlüsse auf das angstähnliche Verhalten können nur anhand des Zusammenspiels verschiedener Messgrößen gezogen werden. Hierzu zählt besonders die *Thigmotaxis* (Aufhalten des Tieres nahe der Wand), das Putzverhalten und die Defäkation (Hall 1934, Archer 1973). Höhere Werte bei diesen Parametern sollen die steigende emotionale Erregtheit des Tieres signalisieren (Denenberg 1969, Royce 1977). Hingegen gilt ein vermehrtes vertikales Aufrichten des Tieres als Anzeichen für ein vermindertes angstähnliches Verhalten (Katz et al. 1981, Prut und Belzung 2003).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen 129S1/SvImJ und C57BL/6JOLA^{Hsd} bezüglich der Aktivität, dem angstähnlichen Verhalten und dem Verhalten im *Open Field*. Die 129S1/SvImJ-Tiere hatten eine deutlich geringere Laufdauer, erkundeten kaum und überquerten weniger Linien im *Open Field* als die C57BL/6JOLA^{Hsd}-Tiere. Diese Beobachtungen sprechen für eine geringere motorische Aktivität der 129S1/SvImJ-Mäuse. Ein gesteigertes angstähnliches Verhalten des Stammes 129S1/SvImJ wird im Vergleich mit den C57BL/6JOLA^{Hsd}-Mäusen anhand einer vermehrten *Thigmotaxis*, einer signifikant verminderten Aufenthaltsdauer im Innenfeld, einer geringeren vertikalen

Aufrichtungsdauer sowie einer vermehrten Anzahl an Kotboli deutlich. In ihrer Putzdauer unterschieden sich die Stämme 129S1/SvImJ und C57BL/6JolaHsd jedoch nicht. Die hybriden Linien, die aus ihrer Kreuzung entstanden, lagen bei den gemessenen Verhaltensparametern meist zwischen denen, die für die Parentalgenerationen ermittelt wurden oder ähnelten denen der C57BL/6JolaHsd-Tiere. In der Laufdauer und in der Anzahl der überquerten Linien unterschieden sich die beiden hybriden Linien zwar nicht voneinander, jedoch signifikant von den beiden Parentalstämmen: sie waren signifikant weniger motorisch aktiv als die C57BL/6JolaHsd-Mäuse, aber aktiver als die 129S1/SvImJ-Tiere. Im Erkundungsverhalten glichen die hybriden Linien den C57BL/6JolaHsd-Mäusen. Das angsthähnliche Verhalten der F1-Hybriden wiederum ließ sich nicht eindeutig einem der beiden Parentalstämme zuordnen. Zwar ähnelte die Aufenthaltsdauer im Innenfeld, besonders die der Hyb1-Tiere, eher der des C57BL/6JolaHsd-Stammes, doch entsprach die Defäkationsmenge der von den 129S1/SvImJ-Mäusen. Die Dauer des vertikalen Aufrichtens der Hyb1- und Hyb2-Tiere lag ebenfalls zwischen der der Elternstämme. Die Hyb2-Linie zeigte darüber hinaus eine signifikant verlängerte Putzdauer verglichen mit den Parentaltieren. Ein signifikanter Einfluss des Geschlechts des Versuchstieres auf das Verhalten im *Open Field* bestand nur bei der Defäkation und dem vertikalen Aufrichten der Mäuse. Die Männchen richteten sich hierbei deutlich länger auf als die Weibchen, zudem setzten sie mehr Kotboli ab.

Die längere vertikale Aufrichtdauer der Männchen im Vergleich mit den weiblichen Versuchstieren könnte als Hinweis auf ein vermindertes angsthähnliches Verhalten männlicher Tiere gewertet werden. Auch in anderen Arbeiten wurde von einem verminderten angsthähnlichen Verhalten männlicher Mäuse berichtet (Chiba et al. 2009, Aoki et al. 2010). Die vermehrte Defäkation würde hingegen für ein vermehrtes angsthähnliches Verhalten der Männchen sprechen. Denkbar ist, dass das vermehrte Aufrichten der Männchen auf Unterschiede in den Coping-Strategien (Stressmanagement-Strategien) männlicher und weiblicher Mäuse zurückzuführen ist und damit nicht *per se* ein vermindertes angsthähnliches Verhalten signalisieren muss. Folgt man der Annahme der unterschiedlichen Coping-Strategien bei männlichen und weiblichen Mäusen, erscheint ein direkter Schluss von dem gezeigten Verhalten der Tiere auf das Ausmaß ihres Stressempfindens und darüber hinaus ein direkter

Vergleich des Stressempfindens männlicher und weiblicher Mäuse nicht möglich. Zu berücksichtigen ist auch, dass die Defäkation von vielen Faktoren beeinflusst wird, wie beispielsweise der vorherigen Nahrungsaufnahme (Archer 1975) und dem Anregen der Verdauung durch motorische Aktivität. Sie muss folglich nicht zwangsläufig mit dem angstähnlichen Verhalten der Mäuse korrelieren.

Die beobachteten Verhaltensparameter unseres 129S1/SvImJ-Stammes korrespondierten mit der schon in der Literatur beschriebenen verminderten motorischen Aktivität und dem vermehrten angstähnlichen Verhalten des 129er-Stammes. Auch in anderen Arbeiten zeigten Mäuse des Stammes C57BL/6 (C57BL/6J, C57BL/6JOlaHsd) eine deutlich höhere motorische Aktivität verglichen mit Tieren verschiedener 129er-Substämme (129S6/SvEvTac, 129T2/SvEms-+^{Ter}/J, 129X1/SvJ, 129S2/SvHsd; Paulus et al. 1999, Contet et al. 2001b) sowie ein geringeres angstähnliches Verhalten (129S2/SvHsd versus C57BL/6JOlaHsd; Contet et al. 2001b).

Lässt man die Aufenthaltsdauer im Innenfeld außer Acht, ist bezüglich der Hybridlinien festzustellen, dass sich diese in ihrem Verhalten im *Open Field* nicht signifikant voneinander unterscheiden. Im Hinblick auf Aktivität, angstähnliches Verhalten und andere definierte Verhaltensparameter im *Open Field* lagen sie zwischen den beiden Parentalgenerationen, welche die Extreme in dieser Studie besetzten. Diese Mittelstellung zeigte sich auch in der Arbeit von Logue und Mitarbeitern (1997), in der die motorische Aktivität der erzeugten hybriden Linie 129B6F1 (leider wird der Substamm der Elterntiere in der Arbeit nicht näher bezeichnet) ebenfalls zwischen der Aktivität der Parentalstämme lag. Eine derartige Mischung der Genotypen führt offensichtlich zu einer motorischen Aktivität und einem angstähnlichen Verhalten, das in etwa dem Mittel beider Parentalstämme entspricht. Ein Heterosis-Effekt, bei dem die Hybridlinien in einigen Parametern signifikant höhere Werte als die Parentalstämme erreichen (Warren 1988), konnte hier für die motorische Aktivität und das angstähnliche Verhalten nicht nachgewiesen werden. Folglich ist auch bei der Erzeugung von Mausmutanten bei der Verwendung der untersuchten Parentalstämme nicht damit zu rechnen, dass allein die Mischung des genetischen Hintergrundes zu Extremwerten hinsichtlich der beschriebenen Verhaltensweisen führt. Eine unbeabsichtigte Beeinflussung der

Ergebnisse durch den genetischen Hintergrund im Rahmen dieser Verhaltensparameter ist somit nahezu ausgeschlossen.

4.3 Olfaktorische Wiedererkennung

4.3.1 Zusammenhang von olfaktorischer Wiedererkennung und Jungtiergeschlecht

In dieser Arbeit zeigte sich weder im Test zur sozialen Diskrimination noch in dessen Modifikation, dem „Lüfterkäfigtest“, ein Einfluss des Jungtiergeschlechts auf die Ausbildung des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses bei Mäusen. Die von Markham und Juraska (2007) bei Ratten beschriebene Abhängigkeit der Wiedererkennung vom Jungtiergeschlecht, wobei weibliche, adulte Ratten männliche Jungtiere nicht wiedererkennen konnten, wurde hier für Mäuse nicht beobachtet. Folglich können bei Mäusen in den Versuchen zur olfaktorischen Wiedererkennung sowohl männliche als auch weibliche Juvenile als Stimulustiere eingesetzt werden, ohne einen Einfluss auf die olfaktorische Wiedererkennung im Sinne einer geschlechtsspezifischen „Attraktivität“ und damit eine bevorzugte Untersuchung befürchten zu müssen.

4.3.2 Zusammenhang von olfaktorischer Wiedererkennung und weiblichem Zyklus

Ein Einfluss des weiblichen Zyklus auf die olfaktorische Wiedererkennung von Artgenossen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die wiederholte Testung derselben 23 Weibchen, die sich dabei einmal im Zyklusstadium des Proöstrus und einmal in dem des „Nicht-Proöstrus“ befanden, ergab für den Versuch „Sampling direkt – Choice direkt“ ein intaktes olfaktorisches Wiedererkennungsgedächtnis für beide Zyklusabschnitte. Der Vergleich der RI-Werte der Weibchen im Proöstrus mit denen im „Nicht-Proöstrus“ bestätigte die vergleichbare

Wiedererkennungsleistung in beiden Zyklusabschnitten. Die Genotyp-unabhängige Untersuchung der Bedeutung des weiblichen Zyklus für alle drei Versuche zur olfaktorischen Wiedererkennung erbrachte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss des Zyklusabschnittes auf das Wiedererkennungsgedächtnis.

Darüber hinaus ergab die Analyse der *Sampling*-Investigationsdauer während des Proöstrus und des „Nicht-Proöstrus“ keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zyklusabschnitten. Folglich scheint auch die Investigationsbereitschaft der Versuchstiere unabhängig vom weiblichen Zyklus zu sein.

Bekannt ist, dass Schwankungen des Östrogenspiegels, entweder im Rahmen des weiblichen Zyklus oder durch eine hormonelle Behandlung des Versuchstieres, zu einer Vielzahl von morphologischen (Murphy und Segal 1996, Woolley 1998), neurochemischen (Lapchak et al. 1990, Luine et al. 1998, Gibbs 2000a) und elektro-physiologischen (Warren et al. 1995, Desmond et al. 2000) Veränderungen in Hirnregionen führen können, von denen angenommen wird, dass sie kausal in Lern- und Gedächtnisprozesse einbezogen sind, einschließlich Hippocampus, Striatum, Amygdala und frontaler Kortex. Höchstwerte von Östrogen werden im weiblichen Zyklus der Maus während des Proöstrus erreicht. Ob diese natürlichen Schwankungen im Östrogenspiegel jedoch ausreichen, um die Lern- und Gedächtnisleistung weiblicher Tiere signifikant zu beeinflussen, wird kontrovers diskutiert: Einige Autoren konnten eine Verbesserung der Lern- und Gedächtnisleistung während des Proöstrus im *Object-placement*-Test (Frye et al. 2007), in der Wiedererkennung von Objekten (Walf et al. 2006, Walf et al. 2009), in einigen Konditionierungstests wie dem *Eye-blink-response*-Test (Wood et al. 2001) sowie in der sozialen Wiedererkennung (Sánchez-Andrade und Kendrick 2011) messen. Berry und Mitarbeiter (1997) sowie Stackman (1997) verneinten hingegen das Vorliegen eines Einflusses des weiblichen Zyklus auf die Gedächtnisleistung, und auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen gegen einen Einfluss auf das Jungtierwiedererkennungsgedächtnis. Die diskrepanten Ergebnisse der angeführten Arbeiten könnten dadurch bedingt sein, dass eine Beeinflussung der Lern- und Gedächtnisleistung durch Östrogen zum einen von der Höhe der Östrogenkonzentration und zum anderen von der Art der untersuchten Gedächtnisleistung abhängt. So ist eine Verbesserung der Gedächtnisleistung bei pharmakologisch hohen Östrogengaben

bekannt (Korol und Kolo 2002, Frye et al. 2007), ob jedoch die Östrogenspitzen im weiblichen Zyklus während des Proöstrus ausreichen, um eine Veränderung der Gedächtnisleistung herbeizuführen, kann nicht als sicher gelten. Zumindest für die olfaktorische Wiedererkennung im sozialen Diskriminationstest kann dies, wie gezeigt, nicht bestätigt werden.

Eine zusätzliche Störgröße, die in derartigen Forschungsansätzen oft ignoriert wird, ist die vaginale Stimulation im Rahmen der Entnahme der Zyklusabstriche. In verschiedenen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass die olfaktorische Gedächtnisleistung durch vaginale Stimulation verbessert wird (Guevara-Guzman et al. 2001, Larrazolo-Lopez et al. 2008). Eine solche Beeinflussung der Gedächtnisleistung ist beim Zustandekommen des „Bruce-Effekts“ von großer Bedeutung, da die vaginale Stimulation während des Paarungsaktes die „Merkfähigkeit“ des Weibchens für den Geruch des sie befruchtenden Männchens verbessert (siehe 1.1.1). Des Weiteren führt die vaginale Stimulation während der Geburt zu einer erleichterten Wiedererkennung des eigenen Wurfs durch die Muttertiere. Bekannt ist diesbezüglich auch eine Zyklusabhängigkeit der vaginalen Stimulation. Es konnte gezeigt werden, dass sie während Proöstrus und Östrus zu einer vermehrten Aktivität der Mitralzellen im *Bulbus olfactorius* und somit zu einer Verbesserung der Gedächtnisleistung führt (Sánchez-Andrade und Kendrick 2009). Hingegen wird während des Diöstrus die Mitralzellaktivität durch vaginale Stimulation vermindert (Sánchez-Andrade und Kendrick 2009). In vielen Studien, die einen Einfluss des weiblichen Zyklus auf die Lern- und Gedächtnisleistung nachweisen konnten (Wood et al. 2001, Walf et al. 2006, Frye et al. 2007, Walf et al. 2009), wurden die Vaginalabstriche zur Zyklusbestimmung jedoch unmittelbar vor dem Experiment entnommen. Somit wurde das Versuchstier direkt vor der Prüfung der Gedächtnisleistung vaginal stimuliert. Daher ist nicht auszuschließen, dass die in diesen Arbeiten gezeigte Abhängigkeit der Lern- und Gedächtnisleistung vom weiblichen Zyklus nicht vielmehr auf die bereits bekannten Effekte der Zyklusabhängigkeit der vaginalen Stimulation auf definierte Gedächtnisleistungen zurückzuführen ist. Um den Einfluss der vaginalen Stimulation auf die Gedächtnisbildung sicher auszuschließen, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Gewinnung der Vaginalabstriche nach dem *Choice*.

4.3.3 Aggressivität gegenüber den Jungtieren

Neben der Investigation des Jungtieres zeigten die Versuchstiere auch aggressives Verhalten gegenüber den Juvenilen. Die während der Durchführung des Versuchs „*Sampling* direkt - *Choice* direkt“ erfasste Dauer des aggressiven Verhaltens der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren war nur bei den weiblichen Tieren signifikant vom Genotyp abhängig. Die Weibchen der Hyb2-Linie verbrachten mehr Zeit in aggressivem Verhalten als die der Hyb1-Linie und die des 129S1/SvImJ-Stammes. Zwischen den Geschlechtern ließ sich jedoch kein Unterschied erkennen. Die geringe Aggressionsdauer der 129S1/SvImJ-Weibchen könnte zum Teil auf deren niedrige motorische Aktivität zurückzuführen sein. Beim Auftreten von Aggressivität gegenüber den Juvenilen flüchteten diese zumeist vor dem Versuchstier. Eine Fortsetzung des aggressiven Verhaltens erforderte somit die Verfolgung des Jungtieres durch das adulte Tier und daher ein hohes Maß an motorischer Aktivität. Interessant in diesem Zusammenhang ist jedoch, dass sich die Weibchen der beiden hybriden Linien in der Ausprägung des aggressiven Verhaltens unterschieden. Eine mögliche Ursache dafür könnten z.B. Unterschiede in der mütterlichen Aufzucht sein. Zwar entstanden beide Linien durch die Kreuzung von 129S1/SvImJ- und C57BL/6J OlaHsd-Mäusen, jedoch wurde die Hyb1-Linie durch 129S1/SvImJ-Mütter aufgezogen und die Hyb2-Linie durch Weibchen vom Stamm C57BL/6J OlaHsd. Die Bedeutung der mütterlichen Aufzucht für das Verhalten der Tiere wird anhand von Versuchen deutlich, in denen Weibchen vom BALB-Stamm C57BL/6J-Embryonen eingepflanzt bzw. C57BL/6J-Junge direkt nach der Geburt ins Nest gelegt wurden. Die von den BALB-Müttern aufgezogenen C57BL/6J-Jungtiere verhielten sich im *Open Field*, im *Morris-Water-Maze* sowie im *Plus-Maze*-Versuch wie BALB-Mäuse. Wurden die Jungtiere zwar von BALB-Müttern ausgetragen, aber von C57BL/6J-Weibchen aufgezogen, so zeigten sie hingegen ein C57BL/6J typisches Verhalten in den genannten Tests (Francis et al. 2003). Besondere Bedeutung in der Entwicklung eines Jungtieres wird dabei der Häufigkeit des mütterlichen Leckens und Putzens der Jungen zugeschrieben. Francis und Mitarbeiter (2003) fanden diesbezüglich bei den C57BL/6J-Müttern ein stärkeres postnatales Leckverhalten als bei den BALB-Müttern. Daraus ließe sich ableiten, dass die

mütterliche Zuwendung einen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung der endokrinen Stressachse sowie auf das Erkundungs- und Lernverhalten bei Mäusen hat.

Über das Verhalten der 129S1/SvImJ-Mäuse bezüglich der Jungtieraufzucht gibt es in diesem Zusammenhang jedoch nur wenige Veröffentlichungen. In einer dazu bekannten Studie leckten und putzten 129Sv-Mütter ihre Jungen deutlich weniger verglichen mit C57BL/6J-Mäusen (Champagne et al. 2007). Diese verminderte mütterliche Zuwendung könnte folglich ein vermehrtes Angst- und Rückzugsverhalten der 129S1/SvImJ- sowie der Hyb1-Tiere mit bedingt und somit zu einer geringeren Aggressivität der adulten Mäuse gegenüber den Jungtieren beigetragen haben.

Es ist jedoch festzustellen, dass, trotz der Spekulationen über die Genotypspezifischen Unterschiede im mütterlichen Verhalten, die diesbezüglich verfügbare Literatur aus wenigen Arbeiten besteht und unsere Beobachtungen mithilfe der bekannten Daten nicht vollständig erklärbar sind. Folglich sind weitere Studien zum mütterlichen Verhalten der untersuchten Genotypen sowie dessen Einfluss auf die Aggressivität der Mäuse im Erwachsenenalter nötig.

Ein Einfluss des Jungtiergeschlechts auf die Aggressivität des Versuchstieres ließ sich in dieser Arbeit nur bei den adulten Weibchen nachweisen. Diese zeigten ein signifikant aggressiveres Verhalten gegenüber den weiblichen Juvenilen, über dessen Ursachen nur spekuliert werden kann. Offensichtliche Unterschiede im Verhalten von weiblichen und männlichen Stimulustieren, welche zu einem höheren Maß an Aggressivität bei den Versuchstieren geführt haben könnten, wurden nicht beobachtet. Möglicherweise erkannten die adulten Weibchen die männlichen Juvenilen als potentielle Sexualpartner, obwohl diese noch nicht im fortpflanzungsfähigen Alter waren, und zeigten deshalb diesen gegenüber ein höheres Maß an Akzeptanz. Auch hier sind weiterführende Studien nötig, um die geschlechtsabhängige vermehrte Aggressivität der Weibchen genauer zu untersuchen.

4.3.4 Investigationsdauer während des *Samplings*

Die Erkundung des Stimulustieres durch das Versuchstier während des *Samplings* bildet die Grundlage für die Ausbildung des sozio-olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses. In den verschiedenen Versuchen hatten die adulten Mäuse entweder die Möglichkeit, das präsentierte Jungtier direkt zu untersuchen oder waren durch den „Lüfterkäfig“ von den nicht-volatilen Stimuli getrennt. Der Einfluss dieser verschiedenen Arten der Jungtierpräsentation sowie des Genotyps und des Geschlechts der verwendeten Versuchstiere auf die Investigationsdauer während des *Samplings* soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

Sowohl während des direkten *Samplings* im ersten Versuch als auch während des indirekten *Samplings* im zweiten Versuch (*Sampling* indirekt – *Choice* direkt) zeigte die Hyb2-Linie eine signifikant längere Investigationsdauer als die 129S1/SvImJ- und die Hyb1-Tiere (siehe Abb. 15 und Abb. 19). Im indirekten *Sampling* des dritten Versuchs (*Sampling* indirekt – *Choice* indirekt) untersuchten die Hyb1-Tiere die Jungtiere genauso lang wie die Hyb2-Tiere. Beide hybride Linien lagen damit über der Investigationsdauer der 129S1/SvImJ-Tiere (siehe Abb. 21). Ein Einfluss des Geschlechts konnte nur beim direkten *Sampling* im ersten Versuch festgestellt werden. Die männlichen Tiere zeigten hierbei deutlich mehr Interesse am Jungtier als die Weibchen. Die Tatsache, dass Weibchen eine kürzere Investigationsdauer bei direktem Jungtierkontakt zeigen, ist bereits von Ratten bekannt (Bluthé und Dantzer 1990) und somit auch für Mäuse bestätigt.

Über die Ursachen für die geringere Investigationsdauer der 129S1/SvImJ-Tiere kann nur spekuliert werden. Man könnte vermuten, dass die motorische Aktivität und das Ausmaß des angeständlichen Verhaltens der Versuchstiere einen Einfluss auf die Investigationsdauer hatten. Im *Open-Field*-Versuch zeigten die 129S1/SvImJ-Mäuse ein deutlich geringeres Lauf- und Erkundungsverhalten verglichen mit den anderen Genotypen (siehe Abb. 10 und 11). Dies bestätigt die in der Literatur beschriebene niedrige motorische Aktivität des 129er-Stammes (Homanics et al. 1999, Sik et al. 2003). Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass die geringe motorische Aktivität der 129er-Mäuse auch zu einer verminderten Investigationsdauer führte. Dies erscheint gerade für das direkte *Sampling* besonders plausibel, da das Ver-

suchstier dem Jungtier folgen muss, um dessen „olfaktorischen Fingerabdruck“ zu erfassen. Beim *Sampling* während des zweiten und dritten Versuchs spielte die motorische Aktivität des Tieres hingegen nur eine untergeordnete Rolle, da ein fest platzierter Lüfter die volatilen Komponenten des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ des Jungtieres in den Versuchskäfig blies. Trotzdem zeigte sich auch in diesen Versuchen eine geringe Investigationsdauer der 129S1/SvImJ-Tiere. Hierbei könnten das im *Open Field* festgestellte und in anderen Arbeiten beschriebene vermehrte angeständliche Verhalten des 129er-Stammes (Holmes et al. 2002, Bothe et al. 2004) und die fehlende Angstreduktion durch Gewöhnung (Hefner et al. 2008, Camp et al. 2009) einen negativen Einfluss auf die Investigationsdauer haben.

Beim Vergleich der durchschnittlichen Investigationsdauer aller drei Versuche ohne Berücksichtigung von Genotyp und Geschlecht fällt auf, dass die Investigationsdauer bei direktem *Sampling* signifikant länger war als bei indirektem *Sampling*.

Die Literatur liefert in diesem Zusammenhang Hinweise darauf, dass die vom VNO detektierten nicht-volatilen Geruchsanteile das Versuchstier motivieren, einen Artgenossen intensiver und andauernder zu untersuchen (Baum 2009). Auch in anderen Publikationen konnte gezeigt werden, dass isolierte volatile Anteile des Mausurins ein nicht so starkes Interesse bei männlichen Mäusen auslösten wie die Kombination aus volatilen und nicht-volatilen Urinanteilen (Humphries et al. 1999). Keller und Mitarbeiter (2006) fanden bei Mäusen, die aufgrund eines zerstörten VNO stark in der Detektion von nicht-volatilen Geruchsanteilen eingeschränkt waren, eine Reduktion der Investigation von Artgenossen verglichen mit Tieren, die über ein intaktes VNO verfügten. Die gemeinsame Präsentation volatiler und nicht-volatiler Geruchsanteile beim direkten *Sampling* scheint folglich einen stärkeren olfaktorischen Stimulus darzustellen als die alleinige Darbietung des volatilen Geruchsprofils im indirekten *Sampling*.

Weiterhin könnte auch die Interaktion zwischen Jungtier und Versuchstier während des direkten *Samplings* die Investigationsdauer beeinflusst haben. Manche Jungtiere begannen sogar ihrerseits das adulte Tier zu erkunden und zogen damit immer wieder die Aufmerksamkeit des Versuchstieres auf sich. Demnach könnte auch das Fehlen der gustatorischen, taktilen sowie visuellen Stimuli bei der indirekten

Präsentation zu einem verminderten Interesse des Versuchstieres am Jungtiergeruch geführt haben.

Festzustellen ist jedoch, dass eine signifikant reduzierte Investigationsdauer während des *Samplings* keinen Prädiktor für ein gestörtes olfaktorisches Gedächtnis, abrufbar 24 h später, liefert.

4.3.5 Die Analyse des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses mittels sozialem Diskriminationstest: *Sampling* direkt – *Choice* direkt

Bei allen Genotypen und beiden Geschlechtern ließ sich eine signifikant kürzere Investigationsdauer des bekannten verglichen mit dem unbekanntem Jungtier feststellen. Dies spricht für ein intaktes Langzeitwiedererkennungsgedächtnis bei allen Versuchstiergruppen. Demnach konnte in dieser Arbeit weder ein Einfluss des Genotyps noch des Geschlechts der Versuchstiere auf die Wiedererkennung nachgewiesen werden.

Eine kürzlich erschienene Arbeit berichtet, entgegen unserer Ergebnisse, über ein gestörtes soziales Kurz- und Langzeitgedächtnis bei 129P2-Mäusen (Sinai et al. 2012). Der Hauptunterschied zwischen der Arbeit von Sinai und Mitarbeitern und der vorliegenden scheint das experimentelle Design des Verhaltenstests zu sein. Das soziale Wiedererkennungsgedächtnis der 129P2-Mäuse wurde mittels des *sozialen Rekognitionstests* untersucht, bei dem das bekannte und das unbekannt Jungtier während des *Choice* nicht gleichzeitig, sondern in getrennten Sessionen präsentiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen der *soziale Diskriminationstest* verwendet, welcher durch eine zeitgleiche Präsentation beider Jungtiere einen direkten Vergleich der Investigationszeiten für das bekannte und das unbekannt Jungtier ermöglicht. Es ist möglich, dass der soziale Rekognitionstest falsch negative Ergebnisse bezüglich des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses bei 129er-Mäusen liefert. Um einen Subtypenunterschied der 129er-Mäuse im sozialen Langzeitgedächtnis sicher auszuschließen, bedarf es jedoch einer Testung der 129P2-Mäuse im sozialen Diskriminationstest.

Die in vielen Studien beschriebenen Gedächtnisdefizite der 129S1/SvImJ-Maus (Moy et al. 2007, Smith et al. 2009) konnten hier im sozialen Diskriminationstest für

die olfaktorische Wiedererkennung nicht beobachtet werden. Somit unterscheiden sie sich nicht von Männchen und Weibchen des Stammes C57BL/6JOLA^{Hsd}, die bei direktem *Sampling* und direktem *Choice* keine Probleme mit dem Wiedererkennen von Jungtieren hatten (Noack et al. 2010; Hädicke und Engelmann 2013). Die vorliegende Arbeit konnte zudem zeigen, dass auch die Tiere aus den hybriden Linien in der Lage waren, Juvenile wiederzuerkennen. Demnach führte auch die Mischung des genetischen Hintergrundes von 129S1/SvImJ- mit C57BL/6JOLA^{Hsd}-Mäusen nicht zu Defiziten in der Ausbildung des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses.

Der Nachweis, dass auch das Geschlecht des adulten Tieres in diesem Versuch ohne Einfluss auf das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis blieb, bildet die Grundlage für den äquivalenten Einsatz von weiblichen und männlichen Tieren im sozialen Diskriminationstest. Selbst die festgestellte gesteigerte Aggressivität der Hyb2-Weibchen verhinderte die Wiedererkennung von Jungtieren nicht. Inwiefern die Aggressivität der Mäuse darüber hinaus als Störgröße für die olfaktorische Diskrimination vernachlässigt werden kann, wurde im Rahmen der durchgeführten Versuche noch nicht abschließend geklärt und bedarf daher weiterer Untersuchungen. Für einen komplikationsarmen Versuchsablauf scheint es jedoch empfehlenswert, bei besonders aggressiven Weibchen männliche Juvenile als Stimulustiere einzusetzen (siehe Abb. 18).

Ähnlich wie beim *Sampling* gab es auch beim *Choice* Unterschiede in der Gesamtinvestigationsdauer. Die Hyb2-Männchen untersuchten die Jungtiere in diesem Versuch deutlich länger als die anderen Genotypen und auch die Hyb2-Weibchen zeigten, besonders im Vergleich mit der Hyb1-Linie, ein vermehrtes Interesse an den Juvenilen. Trotz dieser unterschiedlichen Investigationsdauer zwischen den Versuchstiergruppen während *Sampling* und *Choice* konnten, wie bereits beschrieben, alle Genotypen das bekannte Jungtier wiedererkennen. Dies spricht dafür, dass sowohl für die Akquisition/Konsolidierung als auch für das Abrufen des olfaktorischen Gedächtnisses nur ein kurzer direkter Jungtierkontakt nötig ist. Für eine schnelle Diskrimination von Gerüchen bei Mäusen spricht auch die Arbeit von Abraham und Mitarbeitern (2004). Sie konnten zeigen, dass Mäuse zur Unter-

scheidung eines Geruchsstoffes weniger als 200 ms und zur Unterscheidung binärer Geruchsstoffgemische nur ca. 300 ms benötigten. Zwar ist davon auszugehen, dass aufgrund der Komplexität des Körpergeruchs eines Jungtieres für die Jungtierdiskrimination entsprechend mehr Zeit benötigt wird, doch scheint selbst bei einer Verzehnfachung die anzunehmende Investigationsdauer bei weniger als 10 s zu liegen und mithin deutlich unter der Investigationsdauer, die im indirekten Modell „Lüfterkäfig“ gemessen wurde (~ 25 s; siehe Abb. 19).

Auch das vermehrte aggressive Verhalten der Hyb2-Weibchen (siehe Abb. 17) scheint in diesem Zusammenhang die Investigationsbereitschaft nicht zu stören.

4.3.6 Die Analyse des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses mittels „Lüfterkäfigtest“: *Sampling* indirekt – *Choice* direkt

In diesem Versuch zur olfaktorischen Wiedererkennung konnten die Versuchstiere beim indirekten *Sampling* im „Lüfterkäfig“ nur den volatilen Anteil des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ des Stimulustieres erfassen. Beim anschließenden direkten *Choice* war es den Mäusen hingegen möglich, den gesamten „olfaktorischen Fingerabdruck“ der Juvenilen zu detektieren. Sie erhielten neben den bereits bekannten volatilen zusätzlich die nicht-volatilen Geruchsinformationen des Jungtieres.

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Männchen als auch Weibchen des Stammes 129S1/SvImJ und der Linie Hyb2 ein Jungtier allein anhand des volatilen Fingerabdrucks wiedererkennen. Bei den Hyb1-Tieren erkannten nur die Männchen das vorher präsentierte Jungtier wieder. Versuche mit C57BL/6JOLA^{Hsd}-Männchen und Weibchen ergaben, dass diesen ebenso die vorher dargebotenen volatilen Geruchsanteile eines Jungtieres genügte, um dieses bei der direkten Präsentation während des *Choice* wiederzuerkennen (Noack et al. 2010; Hädicke und Engelmann 2013). Demnach sind beide Elternstämme in der Lage, Jungtiere anhand des volatilen Geruchsprofils wiederzuerkennen. Die fehlende Wiedererkennung der Hyb1-Weibchen kann demzufolge nicht einfach auf durch die Elternstämme vererbte Defizite zurückgeführt werden. Ebenfalls unwahrscheinlich ist, dass die Mischung

der Erbanlagen der Parentalstämme die Ursache für das Fehlen des Wiedererkennungsgedächtnisses ist, da sowohl bei den Männchen beider hybrider Linien als auch bei den Hyb2-Weibchen der gemischte genetische Hintergrund keine Defizite in der Wiedererkennung von Artgenossen erkennen ließ. Über die Ursachen der fehlenden Wiedererkennung der Hyb1-Weibchen in diesem Versuch lassen sich nur Vermutungen anstellen.

Auf den ersten Blick könnte argumentiert werden, dass der Einsatz von C57BL/6JOlaHsd-Jungtieren als Stimulustiere für alle Genotypen zu dem beobachteten Wiedererkennungsdefizit geführt haben kann. In der Tat ist bekannt, dass die Oxytocin-Signalgebung im Gehirn einen Einfluss auf die soziale Wiedererkennung von Tieren innerhalb bzw. zwischen verschiedenen Stämmen hat (Macbeth et al. 2009). Es gibt jedoch keinen Beweis für Unterschiede in der zentralnervalen oxytocinergen Informationsübertragung zwischen C57BL/6JOlaHsd- und 129S1/SvImJ-Mäusen. Darüber hinaus macht die erfolgreiche Wiedererkennung der anderen Gruppen (Hyb1-Männchen sowie Hyb2-Männchen und Weibchen) einen signifikanten Einfluss des Jungtiergenotyps auf das Wiedererkennungsgedächtnis unwahrscheinlich.

Es kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die volatilen Geruchsanteile bei den Hyb1-Weibchen zur Ausbildung eines olfaktorischen Gedächtnisses nicht ausreichten. Zudem könnte es sein, dass diese Tiere nicht in der Lage waren, die bekannten volatilen Eindrücke in das gesamte Profil des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ einzuordnen und so eine Übereinstimmung zu erkennen. Für die letztgenannte These spricht vor allem die lange Gesamtinvestigationdauer der Hyb1-Weibchen während des *Choice*, die deutlich die *Choice*-Gesamtinvestigationdauer der weiblichen Hyb2-Tiere sowie die der 129S1/SvImJ-Weibchen überstieg. Man könnte vermuten, dass die Hyb1-Weibchen die Jungtiere besonders intensiv untersuchten, da es ihnen nicht gelang, die bekannten volatilen Geruchsanteile einem der beiden Juvenilen zuzuordnen.

Der Vergleich der RI-Werte zeigte keinen Einfluss des Versuchstiergeschlechts und des Genotyps auf das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis. Folglich ist analog zum Versuch „*Sampling* direkt – *Choice* direkt“ auch hier der Einsatz weiblicher Tiere problemlos möglich.

4.3.7 Die Analyse des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses mittels „Lüfterkäfigtest“: *Sampling* indirekt – *Choice* indirekt

In diesem Versuch zur olfaktorischen Wiedererkennung erfolgten *Sampling* und *Choice* indirekt im „Lüfterkäfig“. Folglich standen dem Versuchstier sowohl bei Akquisition/Konsolidierung als auch beim Abrufen des olfaktorischen Gedächtnisses nur die volatilen Geruchsanteile des Jungtieres zur Verfügung.

Nur die Männchen des Stammes 129S1/SvImJ und die der Hyb1-Linie zeigten unter diesen Bedingungen eine signifikant kürzere Investigationsdauer des bekannten Jungtieres und damit ein messbares Wiedererkennungsgedächtnis. Obwohl die Hyb2-Männchen, analog zu den Vorversuchen, die Jungtiere am längsten untersuchten, bestand bei ihnen kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeiten für das bekannte und das unbekannte Juvenile. Auch die Weibchen der untersuchten Genotypen zeigten kein intaktes Wiedererkennungsgedächtnis in diesem Versuch. Zwar hatten sowohl die männlichen Hyb2 als auch alle weiblichen Versuchstiere ein vermehrtes Interesse an dem unbekanntem Jungtier, jedoch erreichte der Unterschied in der Investigationsdauer beider Jungtiere dabei nicht das Signifikanzniveau. In der Analyse der olfaktorischen Wiedererkennung mittels RIs zeigte sich im Zwei-Weg-ANOVA jedoch kein Einfluss des Geschlechts oder des Genotyps.

4.3.8 Zusammenfassende Betrachtung der Wiedererkennungsleistung über alle drei Versuche

Die Versuchstiere zeigten beim Wiedererkennen eines Artgenossen nur anhand seines volatilen Geruchsprofils Defizite im Vergleich zur Wiedererkennung mittels des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“. Über die Ursachen dafür lassen sich nur Vermutungen anstellen. Eine mögliche Erklärung liefern Probleme bei der Zuordnung der aus dem *Sampling* bekannten volatilen Anteile zu einem ebenfalls volatilen Geruchsprofil während des *Choice*. Die Zuordnung der volatilen Komponenten gelingt den Versuchstieren hingegen besser, wenn ihnen während des *Choice* der gesamte „olfaktorische Fingerabdruck“ präsentiert wird. Dies könnte damit

zusammenhängen, dass der direkte Kontakt zu den nicht-volatilen Anteilen des Geruchsprofils des Juvenilen, wie beispielsweise zu den HUP, den Versuchstieren einen viel intensiveren Zugang zu den volatilen Liganden dieser Proteine bietet. Man kann vermuten, dass die Versuchstiere bei direktem Jungtierkontakt bereits bekannte volatile Geruchsanteile sogar in höherer Konzentration vorfinden. Bei der Zuordnung zweier volatiler Profile hingegen könnten geringe Änderungen im präsentierten volatilen Profil des Jungtieres zu einer Störung der Wiedererkennung führen. Auch Änderungen der Konzentrationen von durch den Luftstrom übertragenen volatilen Duftstoffen bzw. auch fehlende oder zusätzlich übertragene volatile Komponenten könnten die Wiedererkennung eines volatilen Profils im *Choice* erschweren.

Stellt man sich den „olfaktorischen Fingerabdruck“ des Jungtiers als Puzzle vor, wie in Abbildung 25 und 26 dargestellt, wären die volatilen Informationen, die das Versuchstier im *Sampling* erhält, mit einzelnen Puzzleteilen zu vergleichen. Sie geben der adulten Maus einen Eindruck vom Gesamtbild des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ des Stimulustieres. Präsentiert man dem Versuchstier anschließend, wie beim zweiten Versuch, im direkten *Choice* zwei komplette Puzzlebilder, also den gesamten „olfaktorischen Fingerabdruck“, wird durch den Abgleich der bereits bekannten Puzzleteile mit dem vollständigen Bild eine Wiedererkennung des bekannten Jungtieres möglich (siehe Abb. 25). Beim Versuch mit indirektem *Choice* bekommt das Versuchstier allerdings kein vollständiges Puzzlebild vorgegeben, mit dem es die bekannten Teile nur noch abgleichen muss, sondern erhält ebenfalls nur einzelne Puzzleteile (siehe Abb. 26). Diese können mit den bereits bekannten Teilen übereinstimmen, sich aber zum Teil, wie oben bereits erklärt, auch von ihnen unterscheiden, sodass eine Einpassung in das Puzzle nicht mehr möglich ist (siehe Abb. 26). Dies wiederum könnte dazu führen, dass bei der adulten Maus nur eine eingeschränkte Vorstellung vom Gesamtbild des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ entsteht, wodurch der Abgleich der neu präsentierten Teile mit den bereits aus dem indirekten *Sampling* Bekannten erschwert wird. Für die Vermutung, dass besonders das Einordnen der volatilen Komponenten kritisch ist, spricht auch die Beobachtung, dass die Wiedererkennung bei indirektem *Sampling* und direktem *Choice* den meisten Tieren gelingt.

indirektes Sampling – direktes Choice

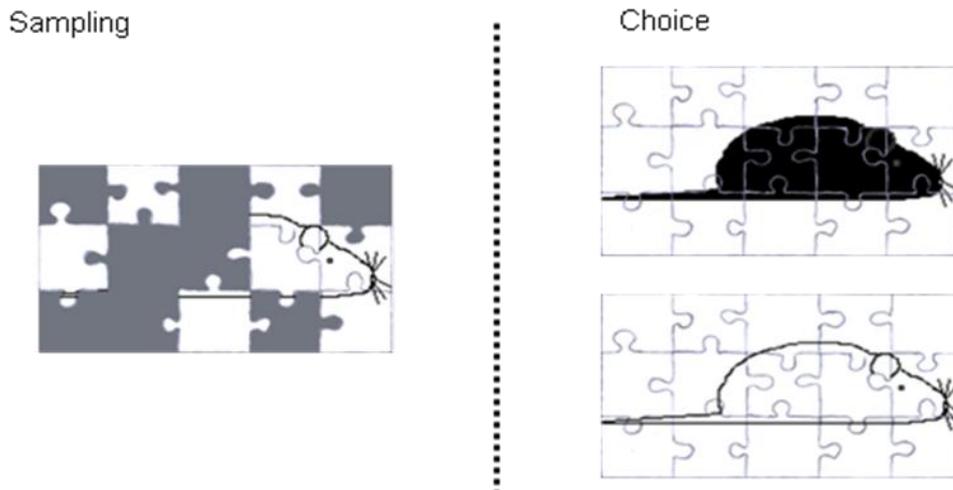


Abb. 25: Symbolische, vereinfachte Darstellung des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ eines Jungtieres (JT) als Puzzle für den Versuch *Sampling* indirekt - *Choice* direkt (weiße Maus = bekanntes JT im *Choice*; schwarze Maus = unbekanntes JT im *Choice*). Beim indirekten *Sampling* im „Lüfterkäfig“ kann das Versuchstier nur das volatile Profil des Jungtieres detektieren (durch die Puzzleleile symbolisiert). Die nicht-volatilen Geruchskomponenten bleiben ihm verborgen (symbolisiert durch die Graufärbung der nicht detektierbaren Teile). Beim direkten *Choice* wird der gesamte „olfaktorische Fingerabdruck“ präsentiert. Das Einpassen der bekannten volatilen Informationen (Puzzleleile) in das Gesamtbild ist somit deutlich erleichtert.

indirektes Sampling – indirektes Choice

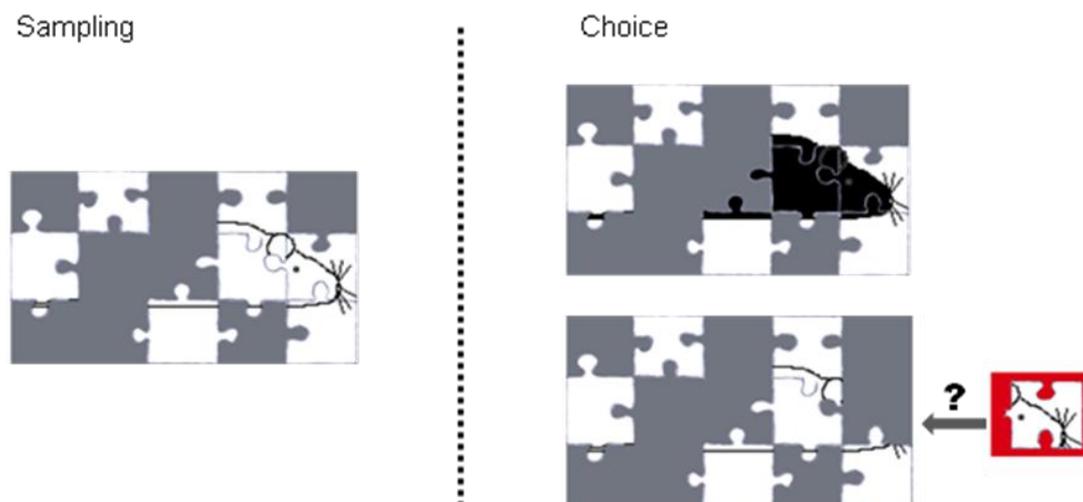


Abb. 26: Symbolische, vereinfachte Darstellung des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ eines Jungtieres (JT) als Puzzle für den Versuch *Sampling* indirekt – *Choice* indirekt (weiße Maus = bekanntes JT im *Choice*; schwarze Maus = unbekanntes JT im *Choice*). Beim *Sampling* wie auch beim *Choice* wird der Maus nur der volatile Anteil des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ präsentiert (Puzzleleile). Die nicht-volatilen Geruchskomponenten bleiben ihm in beiden Sessionen verborgen (symbolisiert durch die Graufärbung der nicht detektierbaren Teile). Durch verschiedene Einflussfaktoren kann es zu geringfügigen Veränderungen des volatilen Profils kommen. Dies könnte dazu führen, dass die veränderten Teile von dem Versuchstier nicht mehr in das Puzzle eingepasst werden können, was diesem die Wiedererkennung des Jungtieres erschwert.

Vergleichbar mit dem Angst- und Aggressionsverhalten (siehe Kapitel 4.3.3), unterliegen auch Lern- und Gedächtnisleistungen umweltbedingten Einflüssen. Liu und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, dass bei Ratten die mütterliche Fürsorge eine direkte Auswirkung auf die Hippocampus-Entwicklung hat und zu Verbesserungen der Hippocampus-abhängigen Lern- und Gedächtnisleistung führt. Im Versuch der sozialen Diskrimination scheinen Unterschiede in der Jungtieraufzucht zwischen C57BL/6JolaHsd- und 129S1/SvImJ-Müttern jedoch keinen Einfluss auf die olfaktorische Gedächtnisleistung zu haben.

Die in vielen Studien beschriebenen Langzeitgedächtnisdefizite der 129S1/SvImJ-Mäuse können von dieser Arbeit weder im sozialen Diskriminationstest noch im „Lüfterkäfigtest“ bestätigt werden. Diesbezüglich ließe sich vermuten, dass die schlechten Ergebnisse des 129er-Stammes in diversen Gedächtnistests auch durch die für den Stamm charakteristische geringe motorische Aktivität bedingt sein könnten. So wird beispielweise als ein Kriterium für gute Lernerfolge im häufig verwendeten *Morris-Water-Maze*-Versuch die Zeit gemessen, die eine Maus bis zum Erreichen einer nicht sichtbaren Plattform benötigt. Geht man jedoch davon aus, dass 129er-Mäuse beim Schwimmen motorisch eingeschränkt sind, wäre die längere zeitliche Latenz bis zum Erreichen der Plattform - durch die motorische Benachteiligung - als Parameter zur Beurteilung der kognitiven Leistung der Mäuse nur eingeschränkt verwertbar. Hierfür sprechen auch die Arbeiten von Contet und Mitarbeitern (2001a) sowie von Wolff und Mitarbeitern (2002), in denen gezeigt wurde, dass C57BL/6J Mäuse im Vergleich mit 129S2/Sv- bzw. 129T2/Sv-Mäusen die Plattform im *Morris-Water-Maze*-Versuch nicht etwa genauer lokalisieren konnten, sondern nur schneller schwammen. Wurde die Weglänge vom Start bis zum Erreichen der Plattform (also der eigentlich kritische Parameter) analysiert, konnten keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Genotypen nachgewiesen werden.

Eine Einschränkung ließe sich auch für die Ergebnisse der 129er-Tiere bei den Versuchen im *T*- und *Y*-Labyrinth anführen, da auch hier der zurückgelegte Weg in die Bewertung der kognitiven Leistung mit eingeht. Dieser Annahme folgend wären der soziale Diskriminationstest sowie dessen Modifikation, der „Lüfterkäfigtest“, auch gut geeignet, Mausstämme mit verschiedener motorischer Aktivität hinsichtlich ihrer Lern- und Gedächtnisleistung zu vergleichen. Dies gilt ebenso für Mäuse mit

schlechtem Sehvermögen, wie beispielsweise die des Stammes 129/SvJ, die in vielen Gedächtnistests aufgrund der schlechten visuellen Orientierung benachteiligt sind.

4.4 Fazit

Insgesamt belegen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation, dass der genetische Hintergrund bei der Betrachtung der Stämme 129S1/SvImJ, C57BL/6JOLA^{Hsd} und den aus ihnen hervorgegangenen hybriden Linien keinen Einfluss auf die olfaktorische Wiedererkennung von Artgenossen hatte.

Die in der Literatur beschriebenen Lern- und Gedächtnisdefizite des 129S1/SvImJ-Stammes betreffen demnach nicht das soziale, olfaktorisch-kodierte Wiedererkennungsgedächtnis der Mäuse. Auch die im *Open Field* gezeigten Unterschiede in der motorischen Aktivität und dem angstheligen Verhalten der Versuchstiere hatten keine Auswirkungen auf das gezeigte olfaktorische Wiedererkennungsvermögen. Die so nachgewiesene Robustheit des sozialen Diskrimination- und des „Lüfterkäfigtests“, die - in Grenzen - auch eine vergleichsweise geringe motorische Aktivität der Versuchstiere kompensierten, eröffnet die Möglichkeit, diese Versuche auch zur Überprüfung der Lern- und Gedächtnisleistung anderer motorisch benachteiligter Mausstämmen zu nutzen.

Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Investigationsdauer während des *Samplings* und *Choice* nicht direkt mit der Ausbildung eines olfaktorischen Gedächtnisses oder dessen Abruf korrelierte. Die Präsentation unterschiedlicher Anteile des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ während des *Samplings* und des *Choice* führte zu der Vermutung, dass kritisch für die Wiedererkennung des volatilen Anteils des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ das Einordnen der im *Sampling* ausgebildeten Gedächtnisspur während des *Choice* ist. Besondere Probleme bereitet es den Tieren dabei, ein bekanntes volatiles Geruchsprofil einem anderen volatilen Profil zuzuordnen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass weibliche Tiere eine vergleichbare Leistung bei der olfaktorischen Wiedererkennung von Artgenossen erbrachten wie die Männchen und dass diese Leistung unabhängig vom weiblichen Zyklus war. Die

Weibchen sind folglich ebenso wie männliche Mäuse als Versuchstiere für den sozialen Diskriminations- und den „Lüfterkäfigtest“ geeignet.

Die Unterschiede in der mütterlichen Aufzucht zwischen 129S1/SvImJ und C57BL/6J OlaHsd scheinen zudem keinen Einfluss auf das soziale Wiedererkennungsgedächtnis der eingesetzten Versuchstiere zu haben. Eine Bedeutung für das gezeigte aggressive Verhalten vor allem der Hyb2-Weibchen kann in diesem Zusammenhang jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.5 Ausblick

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf die neurobiologische Grundlagenforschung, lässt sich feststellen, dass die häufig zur Erzeugung von Mausmutanten genutzten Stämme 129S1/SvImJ und C57BL/6 OlaHsd keine Unterschiede in ihrer sozialen, olfaktorisch-kodierten Langzeitgedächtnisleistung zeigten. Auch das modellhafte Mischen der Gene dieser beiden Stämme, angelehnt an das Mischen von Genen bei der Erzeugung von Mausmutanten (siehe Abb. 1), hatte keinen Einfluss auf die olfaktorische Wiedererkennungsfähigkeit von Artgenossen.

Die Erzeugung von vollständig hybriden Tieren, wie in dieser Arbeit, stellt eine Extremform des gemischten genetischen Hintergrunds dar. Hierbei stammen 50 Prozent der Gene vom potenziellen Stammzellondonor und 50 Prozent vom potenziellen Stammzellempfänger. Es lässt sich jedoch vermuten, dass ein eventuell vorhandener Einfluss der Donorgene so am stärksten hervortritt. Die gezeigte Vergleichbarkeit der Parentalstämme mit den komplett hybriden Tieren hinsichtlich der olfaktorischen Gedächtnisleistung lässt die Vermutung zu, dass die Einbringung von nur ca. 300 Donorgenen (entspricht ca. 1 Prozent des Mausgenoms) (Gerlai 1996) in das Genom der Mausmutante zu keinen Defiziten in der sozialen Diskrimination führt.

Wie in der Einleitung bereits angesprochen, sind die Erkenntnisse über die Bedeutung und Verarbeitungswege von einzelnen Geruchskomponenten noch lückenhaft. Zwar konnte die vorliegende Arbeit nachweisen, dass die volatilen Komponenten des „olfaktorischen Fingerabdrucks“ bei den untersuchten Stämmen ausreichen, um einen Artgenossen olfaktorisch wiederzuerkennen. Welche Hirnareale an

der Verarbeitung, Speicherung und beim Abrufen der volatilen Informationen beteiligt sind, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Diese Arbeit bildet somit in zweifacher Hinsicht einen Grundstein für die weitere Erforschung des olfaktorischen Signalweges. Erstens kann die Erkenntnis, dass der volatile Fingerabdruck bei den untersuchten Mausstämmen zum Wiedererkennen eines Artgenossen genügt, als Grundlage für weitere Experimente zur Analyse der Verarbeitung und/oder des Abrufens dieses Geruchseindrucks genutzt werden. Zweitens ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse davon auszugehen, dass sich die Verwendung von Mausmutanten im sozialen Diskriminations- und „Lüfterkäfigtest“ als unproblematisch bezüglich des gemischten genetischen Hintergrunds darstellt.

Mögliche weitere Versuche könnten beispielsweise der Einsatz von Mäusen mit defektem vomeronasalen Organ oder Riechepithel im „Lüfterkäfigtest“ einschließen, um Informationen über den Anteil beider Sinnesorgane an der Verarbeitung von volatilen Informationen zu erlangen. Alternativ könnte der „Lüfterkäfig“ genutzt werden, um die Beteiligung verschiedener Hirnareale an der Erkennung volatiler Geruchsinformationen zu erforschen.

Darüber hinaus wäre es interessant, zu prüfen, welchen Effekt die Präsentation des gesamten „olfaktorischen Fingerabdrucks“ während des *Samplings* auf den Abgleich mit volatilen Geruchsprofilen während des *Choice* hat. Falls es den Tieren keine Probleme bereitet, das vorher präsentierte Stimulustier nach 24 Stunden wiederzuerkennen, spräche dies für die diskutierte These, dass sich besonders der Abgleich zweier volatiler Profile als problematisch für Mäuse erweist.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses des genetischen Hintergrundes und des Geschlechts auf das olfaktorische Langzeitwiedererkennungsgedächtnis sowie die Analyse der motorischen Aktivität und des angsthellen Verhaltens der Versuchstiere mit Hilfe des *Open-Field*-Tests. Als Versuchstiere dienten dabei männliche und weibliche Mäuse des häufig in der Forschung für Mausmutanten verwendeten embryonalen Stammzellendonors 129S1/SvImJ sowie zwei hybride Linien. Letztere wurden durch die Kreuzung von 129S1/SvImJ-Tieren mit den oft als embryonalen Stammzellakzeptoren dienenden C57BL/6J OlaHsd-Mäusen erzeugt. Im *Open Field* wurde darüber hinaus auch der Parentalstamm C57BL/6J OlaHsd getestet.

Bei der Analyse des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses bei einem Retentionsintervall von 24 Stunden mit Hilfe des sozialen Diskriminationstests und dessen Modifikation, dem „Lüfterkäfigtest“, zeigte sich weder ein Einfluss des Genotyps noch des Geschlechts des Versuchstieres. Die in der Literatur für den Stamm 129S1/SvImJ beschriebenen Defizite bei Lern- und Gedächtnisleitungen könnten für das soziale olfaktorische Langzeitwiedererkennungsgedächtnis nicht bestätigt werden. Auch der weibliche Zyklus der Maus hatte keine Auswirkungen auf die Wiedererkennungsfähigkeit weiblicher Versuchstiere. Folglich ist davon auszugehen, dass beim Einsatz von generierten Mausmutanten in den oben genannten Gedächtnistests der Einfluss des gemischten genetischen Hintergrundes keine kritische Größe darstellt. Zusätzlich bestätigt die vorliegende Arbeit die Vergleichbarkeit des olfaktorischen Gedächtnisses von männlichen und weiblichen Mäusen und bildet somit die Grundlage für den Einsatz von weiblichen Tieren dieser Spezies in den Tests zur sozialen Diskrimination. Die Dauer der von den Versuchstieren gezeigten Aggressivität während des Tests war ebenfalls nicht abhängig vom Versuchstiergeschlecht. Bei den Weibchen konnte jedoch ein Einfluss des Genotyps auf das aggressive Verhalten nachgewiesen werden: Hyb2-Weibchen waren deutlich aggressiver als die weiblichen Mäuse der Stämme Hyb1 und 129S1/SvImJ. Inwiefern dieser Unterschied in der Aggressivität zwischen den hybriden Linien mit der unterschiedlichen mütterlichen Aufzucht zusammenhängt,

bleibt in zukünftigen Studien noch zu klären. Insgesamt waren Weibchen aggressiver gegenüber weiblichen verglichen mit männlichen Jungtieren. Bei den Männchen ließ sich ein solcher Unterschied im Verhalten gegenüber den Juvenilen nicht nachweisen. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das Langzeitwiedererkennungsvermögen aller Versuchstiere nicht abhängig vom Jungtiergeschlecht war und somit künftig Jungtiere beiderlei Geschlechts als Stimulustiere in den Versuchen eingesetzt werden können.

Im *Open Field* zeigte sich eine verminderte motorische Aktivität sowie ein stärker ausgeprägtes angstähnliches Verhalten des Stammes 129S1/SvImJ verglichen mit den C57BL/6J01aHsd-Tieren. Die hybriden Linien lagen sowohl in ihrer motorischen Aktivität als auch im angstähnlichen Verhalten zwischen den Werten der Parentalgeneration. Diese Unterschiede im Verhalten der Versuchstiere schienen jedoch keinen Einfluss auf das olfaktorische Langzeitwiedererkennungsgedächtnis im sozialen Diskriminations- und im „Lüfterkäfigtest“ zu haben, was für die Robustheit beider Tests spricht.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham NM, Spors H, Carleton A u. a.: Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron*. **44**. 865-876 (2004)
- Aoki M, Shimozuru M, Kikusui T u. a.: Sex differences in behavioral and corticosterone responses to mild stressors in ICR mice are altered by ovariectomy in peripubertal period. *Zoological Science*. **27**. 783-789 (2010)
- Archer J: Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour*. **21**. 205-235 (1973)
- Archer J: Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behavioral Biology*. **14**. 451-479 (1975)
- Armstrong SD, Robertson DHL, Cheetham SA u. a.: Structural and functional differences in isoforms of mouse major urinary proteins: a male-specific protein that preferentially binds a male pheromone. *The Biochemical Journal*. **391**. 343-350 (2005)
- Balogh SA, McDowell CS, Stavnezer AJ u. a.: A behavioral and neuroanatomical assessment of an inbred substrain of 129 mice with behavioral comparisons to C57BL/6J mice. *Brain Research*. **836**. 38-48 (1999)
- Bartolomucci A, Gioiosa L, Chirieleison A u. a.: Cross fostering in mice: behavioral and physiological carry-over effects in adulthood. *Genes, Brain, and Behavior*. **3**. 115-122 (2004)
- Baum MJ: Sexual differentiation of pheromone processing: links to male-typical mating behavior and partner preference. *Hormones and Behavior*. **55**. 579-588 (2009)
- Berry B, McMahan R, Gallagher M: Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. *Behavioral Neuroscience*. **111**. 267-274 (1997)
- Bluthé RM, Dantzer R: Social recognition does not involve vasopressinergic neurotransmission in female rats. *Brain research*. **2**. 301-304 (1990)
- Bluthé RM, Dantzer R: Role of the vomeronasal system in vasopressinergic modulation of social recognition in rats. *Brain Research*. **604**. 205-210 (1993)

- Bothe GWM, Bolivar VJ, Vedder MJ u. a.: Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes, Brain, and Behavior*. **3**. 149-157 (2004)
- Brennan PA, Kendrick KM: Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. **361**. 2061-2078 (2006)
- Brennan PA, Zufall F: Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*. **444**. 308-315 (2006)
- Brooks SP, Pask T, Jones L u. a.: Behavioural profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. II: cognitive tests. *Genes, Brain, and Behavior*. **4**. 307-317 (2005)
- Brown RE: What is the role of the immune system in determining individually distinct body odours?. *International Journal of Immunopharmacology*. **17**. 655-661 (1995)
- Bruce HM: A comparison of olfactory stimulation and nutritional stress as pregnancy-blocking agents in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*. **6**. 221-227 (1963)
- Camp M, Norcross M, Whittle N u. a.: Impaired Pavlovian fear extinction is a common phenotype across genetic lineages of the 129 inbred mouse strain. *Genes, Brain, and Behavior*. **8**. 744-752 (2009)
- Champagne FA, Curley JP, Keverne EB u. a.: Natural variations in postpartum maternal care in inbred and outbred mice. *Physiology & Behavior*. **91**. 325-334 (2007)
- Chesler EJ, Plitt A, Fisher D u. a.: Quantitative trait loci for sensitivity to ethanol intoxication in a C57BL/6J × 129S1/SvImJ inbred mouse cross. *Mammalian Genome*. **23**. 305-321 (2012)
- Chiba S, Matsuwaki T, Yamanouchi K u. a.: Alteration in anxiety with relation to the volume of the locus ceruleus in progranulin-deficient mice. *The Journal of Reproduction and Development*. **55**. 518-522 (2009)
- Contet C, Rawlins JN, Bannerman DM: Faster is not surer - a comparison of C57BL/6J and 129S2/Sv mouse strains in the watermaze. *Behavioural Brain Research*. **125**. 261-267 (2001a)

- Contet C, Rawlins JN, Deacon RM: A comparison of 129S2/SvHsd and C57BL/6J OlaHsd mice on a test battery assessing sensorimotor, affective and cognitive behaviours: implications for the study of genetically modified mice. *Behavioural Brain Research*. **124**. 33-46 (2001b)
- Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC: Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science (New York, N.Y.)*. **284**. 1670-1672 (1999)
- Crawley JN: Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse strains. *Trends in Neurosciences*. **19**. 181-182 (1996)
- Curley JP, Davidson S, Bateson P u. a.: Social enrichment during postnatal development induces transgenerational effects on emotional and reproductive behavior in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. **3**. 25 (2009)
- Dantzer R, Bluthé RM, Koob GF u. a.: Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology*. **91**. 363-368 (1987)
- Denenberg VH: Open-Field Behavior in the rat: what does it mean?. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **159**. 852-859 (1969)
- Desmond NL, Zhang DX, Levy WB: Estradiol enhances the induction of homosynaptic long-term depression in the CA1 region of the adult, ovariectomized rat. *Neurobiology of Learning and Memory*. **73**. 180-187 (2000)
- Eibl-Eibesfeldt I: Beiträge zur Biologie der Haus- und der Ährenmaus nebst einigen Beobachtungen an anderen Nagern. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. **7**. 558-587 (1950)
- Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R: Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiology & Behavior*. **58**. 315-321 (1995)
- Engelmann M: Competition between two memory traces for long-term recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. **91**. 58-65 (2009)
- Engelmann M, Hädicke J, Noack J: Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. *Nature Protocols*. **6**. 1152-1162 (2011)
- Francis DD, Szegda K, Campbell G u. a.: Epigenetic sources of behavioral differences in mice. *Nature neuroscience*. **6**. 445-446 (2003)

- Frye CA, Duffy CK, Walf AA: Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. *Neurobiology of Learning & Memory*. **88**. 208-16 (2007)
- Gerlai R: Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype?. *Trends in Neurosciences*. **19**. 177-181 (1996)
- Gibbs RB: Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. *Neuroscience*. **101**. 931-938 (2000a)
- Guevara-Guzman R, Buzo E, Larrazolo A u. a.: Vagino-cervical stimulation-induced release of classical neurotransmitters and nitric oxide in the nucleus of the solitary tract varies as a function of the oestrus cycle. *Brain Research*. **898**. 303-313 (2001)
- Hädicke J, Engelmann M: Social investigation and long-term recognition memory performance in 129S1/SvImJ and C57BL/6JOLA-Hsd mice and their hybrids. *PLoS ONE*. **8**. e54427 (2013)
- Hall CS: Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology (1921)*. **18**. 385-403 (1934)
- Halpern M, Martínez-Marcos A: Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*. **70**. 245-318 (2003)
- Hay DA: Genetics in the analysis of behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **4**. 489-508 (1980)
- Hefner K, Whittle N, Juhasz J u. a.: Impaired fear extinction learning and cortico-amygdala circuit abnormalities in a common genetic mouse strain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. **28**. 8074-8085 (2008)
- Holmes A, Wrenn CC, Harris AP u. a.: Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes, Brain, and Behavior*. **1**. 55-69 (2002)
- Homanics GE, Quinlan JJ, Firestone LL: Pharmacologic and behavioral responses of inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mouse lines. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. **63**. 21-26 (1999)
- Humphries RE, Robertson DH, Beynon RJ u. a.: Unravelling the chemical basis of competitive scent marking in house mice. *Animal Behaviour*. **58**. 1177-1190 (1999)

- Hurst JL, Robertson DH, Beynon RJ u. a.: Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Animal Behaviour*. **55**. 1289-1297 (1998)
- Hurst JL, Beynon RJ: Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. **26**. 1288-1298 (2004)
- Hurst JL, Thom MD, Nevison CM u. a.: MHC odours are not required or sufficient for recognition of individual scent owners. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*. **272**. 715-724 (2005)
- Kaba H, Nakanishi S: Synaptic mechanisms of olfactory recognition memory. *Reviews in the Neurosciences*. **6**. 125-141 (1995)
- Kalueff AV, Keisala T, Minasyan A u. a.: Influence of paternal genotypes on F1 behaviors: lessons from several mouse strains. *Behavioural Brain Research*. **177**. 45-50 (2007)
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ: Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **5**. 247-251 (1981)
- Keller M, Pierman S, Douhard Q u. a.: The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *The European Journal of Neuroscience*. **23**. 521-530 (2006)
- Keller M, Baum MJ, Brock O u. a.: The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behavioural Brain Research*. **200**. 268-276 (2009)
- Kogan JH, Frankland PW, Silva AJ: Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*. **10**. 47-56 (2000)
- Korol DL, Kolo LL: Estrogen-induced changes in place and response learning in young adult female rats. *Behavioral Neuroscience*. **116**. 411-420 (2002)
- Lapchak PA, Araujo DM, Quirion R u. a.: Chronic estradiol treatment alters central cholinergic function in the female rat: effect on choline acetyltransferase activity, acetylcholine content, and nicotinic autoreceptor function. *Brain Research*. **525**. 249-255 (1990)
- Larrazolo-Lopez A, Kendrick KM, Aburto-Arciniega M u. a.: Vagino-cervical stimulation enhances social recognition memory in rats via oxytocin release in the olfactory bulb. *Neuroscience*. **152**. 585-93 (2008)

- Lathe R: Mice, gene targeting and behaviour: more than just genetic background. *Trends in Neurosciences*. **19**. 183-186 (1996)
- Lee AW, Emsley JG, Brown RE u. a.: Marked differences in olfactory sensitivity and apparent speed of forebrain neuroblast migration in three inbred strains of mice. *Neuroscience*. **118**. 263-270 (2003)
- Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC u. a.: Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*. **405**. 792-796 (2000)
- Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P u. a.: MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science (New York, N.Y.)*. **306**. 1033-1037 (2004)
- Linnaeus C: *Systema naturae: per Regna tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Buch 1, Auflage 10, Stockholm, Salvii. 1-824 (1758)
- Liu D, Diorio J, Day JC u. a.: Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience*. **3**. 799-806 (2000)
- Logue SF, Owen EH, Rasmussen DL u. a.: Assessment of locomotor activity, acoustic and tactile startle, and prepulse inhibition of startle in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience*. **80**. 1075-1086 (1997)
- Luine VN, Richards ST, Wu VY u. a.: Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Hormones and Behavior*. **34**. 149-162 (1998)
- Macbeth AH, Lee H-J, Edds J: Oxytocin and the oxytocin receptor underlie intrastrain, but not interstrain, social recognition. *Genes, brain, and behavior*. **8**. 558-567 (2009)
- Markham JA, Juraska JM: Social recognition memory: influence of age, sex, and ovarian hormonal status. *Physiology & Behavior*. **92**. 881-888 (2007)
- Martínez-García F, Martínez-Ricós J, Agustín-Pavón C u. a.: Refining the dual olfactory hypothesis: pheromone reward and odour experience. *Behavioural Brain Research*. **200**. 277-286 (2009)
- Matochik JA: Role of the main olfactory system in recognition between individual spiny mice. *Physiology & Behavior*. **42**. 217-222 (1988)

- Montkowski A, Poettig M, Mederer A u. a.: Behavioural performance in three substrains of mouse strain 129. *Brain Research*. **762**. 12-18 (1997)
- Moy SS, Nadler JJ, Young NB u. a.: Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behavioural Brain Research*. **176**. 4-20 (2007)
- Murphy DD, Segal M.: Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. **16**. 4059-4068 (1996)
- Nevison CM, Armstrong S, Beynon RJ u. a.: The ownership signature in mouse scent marks is involatile. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*. **270**. 1957-1963 (2003)
- Noack J, Richter K, Laube G u. a.: Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. **94**. 568-575 (2010)
- O'Connell RJ, Meredith M: Effects of volatile and nonvolatile chemical signals on male sex behaviors mediated by the main and accessory olfactory systems. *Behavioral Neuroscience*. **98**. 1083-1093 (1984)
- O'Donnell V, Blanchard RJ, Blanchard DC: Mouse aggression increases after 24 hours of isolation or housing with females. *Behavioral and Neural Biology*. **32**. 89-103 (1981)
- Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL u. a.: Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience*. **80**. 1087-1099 (1997)
- Paulus MP, Dulawa SC, Ralph RJ u. a.: Behavioral organization is independent of locomotor activity in 129 and C57 mouse strains. *Brain Research*. **835**. 27-36 (1999)
- Priebe K, Romeo RD, Francis DD u. a.: Maternal influences on adult stress and anxiety-like behavior in C57BL/6J and BALB/cJ mice: a cross-fostering study. *Developmental Psychobiology*. **47**. 398-407 (2005)
- Prut L, Belzung C: The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. **463**. 3-33 (2003)

- Restivo L, Chaillan FA, Ammassari-Teule M u. a.: Strain Differences in Rewarded Discrimination Learning Using the Olfactory Tubing Maze. *Behavior Genetics*. **36**. 923-934 (2006)
- Richter K, Wolf G, Engelmann M: Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learning & Memory*. **12**. 407-13 (2005)
- Royce JR: On the construct validity of open-field measures. *Psychological Bulletin*. **84**. 1098-1106 (1977)
- Röck F, Mueller S, Weimar U u. a.: Comparative analysis of volatile constituents from mice and their urine. *Journal of Chemical Ecology*. **32**. 1333-1346 (2006)
- Sánchez-Andrade G, James BM, Kendrick KM: Neural encoding of olfactory recognition memory. *Journal of Reproduction*. **51**. 547-558 (2005)
- Sánchez-Andrade G, Kendrick KM: The main olfactory system and social learning in mammals. *Behavioural Brain Research*. **200**. 323-335 (2009)
- Sánchez-Andrade G, Kendrick KM: Roles of α - and β -estrogen receptors in mouse social recognition memory: effects of gender and the estrous cycle. *Hormones and Behavior*. **59**. 114-122 (2011)
- Sawyer TF, Hengehold AK, Perez WA: Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. *Behavioral Neuroscience*. **98**. 908-913 (1984)
- Schilling A, Serviere J, Gendrot G u. a.: Vomeronasal activation by urine in the primate *Microcebus murinus*: a 2 DG study. *Experimental Brain Research*. **81**. 609-618 (1990)
- Sik A, van Nieuwehuyzen P, Prickaerts J u. a.: Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behavioural Brain Research*. **147**. 49-54 (2003)
- Silberstein GB, Van Horn K, Hrabeta-Robinson E u. a.: Estrogen-triggered delays in mammary gland gene expression during the estrous cycle: evidence for a novel timing system. *The Journal of Endocrinology*. **190**. 225-239 (2006)
- Simpson EM, Linder CC, Sargent EE u. a.: Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nature Genetics*. **16**. 19-27 (1997)
- Sinai L, Mathew R, Roder JC: Impaired social memories in 129P2 inbred mice are rescued by reduced *Csk* expression. *Genes Brain Behav*. **11**. 559-567 (2012)

- Singer AG, Beauchamp GK, Yamazaki K: Volatile signals of the major histocompatibility complex in male mouse urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**. 2210-2214 (1997)
- Singh PB, Brown RE, Roser B: MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature*. **327**. 161-164 (1987)
- Singh PB: Chemosensation and genetic individuality. *Reproduction (Cambridge, England)*. **121**. 529-539 (2001)
- Skarnes WC, Rosen B, West AP u. a.: A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. **474**. 337-342 (2011)
- Smith AG: Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation. *Seminars in Cell Biology*. **3**. 385-399 (1992)
- Smith DR, Burruss DR, Johnson AW: An assessment of olfaction and responses to novelty in three strains of mice. *Behavioural Brain Research*. **201**. 22-28 (2009)
- Spehr M, Spehr J, Ukhanov K u. a.: Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. **63**. 1476-1484 (2006)
- Stackman RW, Blasberg ME, Langan CJ u. a.: Stability of spatial working memory across the estrous cycle of Long-Evans rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. **67**. 167-171 (1997)
- Swann J, Rahaman F, Bijak T u. a.: The main olfactory system mediates pheromone-induced fos expression in the extended amygdala and preoptic area of the male Syrian hamster. *Neuroscience*. **105**. 695-706 (2001)
- Thompson WR: The inheritance of behaviour: behavioural differences in fifteen mouse strains. *Canadian Journal of Psychology*. **7**. 145-155 (1953)
- Võikar V, Kõks S, Vasar E u. a.: Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiology & Behavior*. **72**. 271-281 (2001)
- Wahlsten D: Deficiency of corpus callosum varies with strain and supplier of the mice. *Brain Research*. **239**. 329-347 (1982)
- Walf AA, Rhodes ME, Frye CA: Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats. *Neurobiology of Learning & Memory*. **86**. 35-46 (2006)

- Walf AA, Koonce C, Manley K u. a.: Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. *Behavioural Brain Research*. **196**. 254-260 (2009)
- Wanisch K, Wotjak CT, Engelmann M: Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. *Behavioural Brain Research*. **186**. 191-196 (2008)
- Ward R, Tremblay L, Lassonde M: The relationship between callosal variation and lateralization in mice is genotype-dependent. *Brain Research*. **424**. 84-88 (1987)
- Warren JM: Age, incentives, and maze learning by hybrid mice. *Behavior Genetics*. **18**. 167-173 (1988)
- Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM u. a.: LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Research*. **703**. 26-30 (1995)
- Whittle N, Hauschild M, Lubec G u. a.: Rescue of impaired fear extinction and normalization of cortico-amygdala circuit dysfunction in a genetic mouse model by dietary zinc restriction. *J Neurosci*. **30**. 13586-13596 (2010)
- Wolff M, Savova M, Gael M u. a.: Differential learning abilities of 129T2/Sv and C57BL/6J mice as assessed in three water maze protocols. *Behavioural brain research*. **136**. 463-474 (2002)
- Wood GE, Beylin AV, Shors TJ: The contribution of adrenal and reproductive hormones to the opposing effects of stress on trace conditioning in males versus females. *Behavioral Neuroscience*. **115**. 175-187 (2001)
- Woolley CS: Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Hormones and Behavior*. **34**. 140-148 (1998)
- Wysocki CJ, Wellington JL, Beauchamp GK: Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science (New York, N.Y.)*. **207**. 781-783 (1980)
- Xu F, Schaefer M, Kida I u. a.: Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *The Journal of Comparative Neurology*. **489**. 491-500 (2005)

Yamazaki K, Beauchamp GK Wysocki CJ u. a.: Recognition of H-2 types in relation to the blocking of pregnancy in mice. *Science (New York, N.Y.)*. **221**. 186-188 (1983)

Yamazaki K, Beauchamp GK Singer A u. a.: Odortypes: their origin and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**. 1522-1525 (1999)

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Mario Engelmann für die hervorragende Betreuung, die vielen anregenden Diskussionen und den motivierenden Zuspruch. Kurzum, für das Engagement und die Unermüdlichkeit, mit der er den Entstehungsprozess der vorliegenden Arbeit begleitet hat. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des ehemaligen Institutes für Medizinische Neurobiologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bedanken. Insbesondere Frau Rita Murau danke ich von Herzen für ihre helfende Hand und die wertvollen Hinweise bei der Durchführung der Experimente. Für die Hilfe bei der Züchtung der beiden hybriden Versuchstierlinien bedanke ich mich bei Frau Gudrun Schmidt, ebenso so wie für die vielen Ratschläge beim Umgang mit den Versuchstieren. Besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. Julia Noack, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, und meinen Freunden Christina Goll und Stefan Köhler, die mir durch ihr umsichtiges Lektorat halfen, dem Text eine klarere Struktur zu geben und seine Fehler auszumerzen. Meinem Freund Robin Krause danke ich für seine unermüdliche Unterstützung, die vielen Anregungen und den stetigen Ansporn während des Schreibprozesses.

8 Versicherung an Eides statt

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

*Zum Einfluss des Genotyps und des Geschlechts auf ausgewählte
Verhaltensparameter einschließlich des sozio-olfaktorischen
Langzeitwiedererkennungsgedächtnisses von Mäusen des 129S1/SvImJ-Stammes und
129S1/SvImJ-C57BL/6JOLA^{Hsd}-Hybriden*

am Institut für Biochemie und Zellbiologie mit Unterstützung durch Prof. Mario Engelmann ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

9 Darstellung des Bildungsweges

Name	Jana Hädicke
Geburtsdatum	24. 07. 1985
Geburtsort	Magdeburg
Wohnhaft	Guts-Muths-Weg 10 39112 Magdeburg

Ausbildung

Seit März 2012	Assistenzärztin an der HNO Klinik im AMEOS Klinikum Halberstadt
November 2011	Staatsexamen und Approbation als Ärztin
Seit 2006	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
Oktober 2005	Beginn des Humanmedizinstudiums an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke- Universität in Magdeburg
Juni 2005	Abitur am Immanuel-Kant-Gymnasium in Magdeburg

Veröffentlichungen

Engelmann, Hädicke & Noack (2011): Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. *Nature Protocols* 6 (8): 1152-1162.

Hädicke & Engelmann (2013): Social investigation and long-term recognition memory performance in 129S1/SvImJ and C57BL/6JOLA_{Hsd} mice and their hybrids. *PLoS ONE* 8(1): e54427

10 Anhang

Open-Field-Versuch

Tab. 1: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Dauer des Aufenthalts im Innenfeld des *Open Field* (M = Männchen, W = Weibchen, 129 = 129S1/SvImJ, C57 = C57BL/6JOLAhsd)

Zwei-Weg-ANOVA Aufenthalt im Innenfeld										
Faktor Genotyp					$F_{3,149} = 27,78$		$p < 0,001$			
Faktor Geschlecht					$F_{1,149} = 3,29$		$p = 0,07$			
Interaktion der Faktoren					$F_{3,149} = 5,22$		$p < 0,05$			
Post-hoc-Test nach Scheffé										
	M	W	M	W	M	W	M	W		
	129	129	Hyb1	Hyb1	Hyb2	Hyb2	C57	C57		
M 129	0	0,20	5,00**	0,74	0,82	0,31	2,85**	6,07**		
W129	0,20	0	7,22**	1,69	1,82	1,02	4,58**	8,50**		
M Hyb1	5,00**	7,22**	0	1,73	1,69	2,81**	0,30	0,05		
W Hyb1	0,74	1,69	1,73	0	0,001	0,10	0,61	2,37*		
M Hyb2	0,82	1,82	1,69	0,001	0	0,12	0,58	2,33*		
W Hyb2	0,31	1,02	2,81**	0,10	0,12	0	1,27	3,63**		
M C57	2,85**	4,58**	0,30	0,61	0,58	1,27	0	0,60		
W C57	6,07**	8,50**	0,05	2,37*	2,33*	3,63**	0,60	0		
Ein-Weg-ANOVA Aufenthalt im Innenfeld ohne Beachtung des Geschlechts										
Faktor Genotyp					$F_{3,153} = 26,07$		$p < 0,001$			
Post-hoc Test nach Scheffé										
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2	C57BL/6						
129S1/SvImJ	0	13,76**	3,87*	22,57**						
Hyb1	13,76**	0	3,04*	0,96						
Hyb2	3,87*	3,04*	0	7,58**						
C57BL/6	22,57**	0,96	7,58**	0						
** p<0,01 * p<0,05										

Tab. 2: Darstellung der Aufenthaltsdauer im Außenfeld des *Open Field* für vier Genotypen und beide Geschlechter (Männchen = M, Weibchen = W)

Genotyp	129S1/SvImJ		Hyb1		Hyb2		C57BL/6J0laHsd	
	M	W	M	W	M	W	M	W
Aufenthalt im Außenfeld in Sekunden	600	591,6	555,4	600	593,1	600	577	547,5
	591	600	538,7	571,9	579,1	600	566,9	515,5
	599	600	534,7	600	600	600	576,5	561,2
	579,3	600	490	600	576	593,1	582,4	547,5
	598,2	600	550,6	587,2	600	600	568	536,5
	594,5	600	567,2	587,8	580,3	596,7	567,2	583,7
	599,5	600	587	567,7	577,6	587,6	562,6	570,2
	599,5	600	591	585,2	573,7	572,7	570,9	575,2
	600	600	563,6	585	578,9	586,9	572,1	559,2
	600	600	589,6	600	594,2	584,5	583,3	559,6
	600	600	570,9	569,6	586,5	589,8	585,2	579
	600	600	552,5	587,4	575,7	587,6	582,1	573,6
	587	600	588	576,8	574,7	600	589,8	584,9
	595,5	600	576	563,6	593	589,8	578	581,3
	587	600	582,5	595,1	582,7	579,4	550,3	577,2
	570,6	600	600	588	586,6	569,7	572,6	575,7
	583	600	573,4	560,7	577,3	571,4	573,4	569,4
	600	594,5	571,4	584,9	578,8	587,9	573,6	562
	595,4	600	586,5		579,2	583,5	582,3	576
	600	600	598,3			572,8	579,2	579,6
Mittelwert	594	599,3	568,4	583,9	583,5	587,7	574,7	565,7
Standard- abweichung	8,433	2,19	26,29	12,91	8,55	10,28	9,049	17,74

Tab. 3: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Anzahl der überquerten Linien im *Open Field* (M = Männchen, W = Weibchen, 129 = 129S1/SvImJ, C57 = C57BL/6JolaHsd)

Zwei-Weg-ANOVA überquerte Linien								
Faktor Genotyp	$F_{3,149} = 76,05$			$p < 0,001$				
Faktor Geschlecht	$F_{1,149} = 2,17$			$p = 0,14$				
Interaktion der Faktoren	$F_{3,149} = 8,47$			$p < 0,001$				
Post-hoc Test nach Scheffé								
	M	W	M	W	M	W	M	W
	129	129	Hyb1	Hyb1	Hyb2	Hyb2	C57	C57
M 129	0	1,76	5,93**	1,88	1,83	2,28*	7,92**	15,22**
W 129	1,76	0	14,16**	7,10**	7,09**	8,05**	17,15**	27,35**
M Hyb1	5,93**	14,16**	0	1,00	1,11	0,86	0,14	2,15*
W Hyb1	1,88	7,10**	1,00	0	0,001	0,01	1,87	5,89**
M Hyb2	1,83	7,09**	1,11	0,001	0	0,02	2,03	6,25**
W Hyb2	2,28*	8,05**	0,86	0,01	0,02	0	1,70	5,72**
M C57	7,92**	17,15**	0,14	1,87	2,03	1,70	0	1,18
W C57	15,22**	27,35**	2,15*	5,89**	6,25**	5,72**	1,18	0
Ein-Weg-ANOVA überquerte Linien ohne Beachtung des Geschlechts								
Faktor Genotyp	$F_{3,153} = 67,28$			$p < 0,001$				
Post-hoc Test nach Scheffé								
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2	C57BL/6				
129S1/SvImJ	0	26,87**	17,68**	65,34**				
Hyb1	26,87**	0	1	7,81**				
Hyb2	17,68**	1	0	14,65**				
C57BL/6	65,34**	7,81**	14,65**	0				
** $p < 0,01$ * $p < 0,05$								

Tab. 4: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für das Verhalten im *Open Field*: Laufdauer (M = Männchen, W = Weibchen, 129 = 129S1/SvImJ, C57 = C57BL/6JolaHsd)

Zwei-Weg-ANOVA Laufen								
Faktor Genotyp	F _{3,149} = 80,14						p < 0,001	
Faktor Geschlecht	F _{1,149} = 2,69						p = 0,1	
Interaktion der Faktoren	F _{3,149} = 7,80						p < 0,001	
Post-hoc-Test nach Scheffé								
	M 129	W 129	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2	M C57	W C57
M 129	0	2,28*	4,75**	1,79	2,61*	3,14**	8,55**	14,83**
W129	2,28*	0	13,61**	7,88**	9,64**	10,77**	19,66**	28,74**
M Hyb1	4,75**	13,61**	0	0,61	0,29	0,17	0,55	2,80**
W Hyb1	1,79	7,88**	0,61	0	0,063	0,15	2,28*	5,81**
M Hyb2	2,61*	9,64**	0,29	0,06	0	0,02	1,62	4,78**
W Hyb2	3,14**	10,77**	0,17	0,15	0,018	0	1,33	4,32**
M C57	8,55**	19,66**	0,55	2,28*	1,62	1,33	0	0,86
W C57	14,83**	28,74**	2,80**	5,81**	4,78**	4,32**	0,86	0

Ein -Weg-ANOVA Laufen ohne Beachtung des Geschlechts				
Faktor Genotyp	F _{3,153} = 71,40			p < 0,001
Post-hoc Test nach Scheffé				
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2	C57Bl/6
129S1/SvImJ	0	25,85**	24,34**	69,86**
Hyb1	25,85**	0	0,03	10,03**
Hyb2	24,34**	0,03	0	11,37**
C57BL/6	69,86**	10,03**	11,37**	0

**** p<0,01 * p<0,05**

Tab. 5: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für das Verhalten im *Open Field*: Erkunden (M = Männchen, W = Weibchen, 129 = 129S1/SvImJ, C57 = C57BL/6JOLA_{Hsd})

Zwei-Weg-ANOVA Erkunden								
Faktor Genotyp	F _{3,149} = 14,34				p < 0,001			
Faktor Geschlecht	F _{1,149} = 2,99				p = 0,0856			
Interaktion der Faktoren	F _{3,149} = 9,68				p < 0,001			
Post-hoc-Test nach Scheffé								
	M 129	W 129	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2	M C57	W C57
M 129	0	1,11	1,04	0,54	0,13	2,86**	2,15*	0,02
W129	1,11	0	4,30**	3,09**	1,97	7,53**	6,34**	1,43
M Hyb1	1,04	4,30**	0	0,07	0,41	0,45	0,20	0,77
W Hyb1	0,54	3,09**	0,07	0	0,14	0,83	0,48	0,35
M Hyb2	0,13	1,97	0,41	0,14	0	1,70	1,17	0,05
W Hyb2	2,86**	7,53**	0,45	0,83	1,70	0	0,05	2,39*
M C57	2,15*	6,34**	0,20	0,48	1,17	0,05	0	1,75
W C57	0,02	1,43	0,77	0,35	0,05	2,40*	1,75	0
Ein -Weg-ANOVA Erkunden ohne Beachtung des Geschlechts								
Faktor Genotyp	F _{3,153} = 12,42				p < 0,001			
Post-hoc Test nach Scheffé								
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2	C57BL/6				
129S1/SvImJ	0	7,74**	9,63**	6,97**				
Hyb1	7,74**	0	0,09	0,03				
Hyb2	9,63**	0,09	0	0,23				
C57BL/6	6,97**	0,03	0,23	0				
** p<0,01 * p<0,05								

Tab. 6: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für das Verhalten im *Open Field*: Aufrichtdauer (M = Männchen, W = Weibchen, 129 = 129S1/SvImJ, C57 = C57BL/6JOLA_{Hsd})

Zwei-Weg-ANOVA Aufrichten								
Faktor Genotyp	F _{3,149} = 72,21			p < 0,001				
Faktor Geschlecht	F _{1,149} = 9,77			p < 0,01				
Interaktion der Faktoren	F _{3,149} = 0,69			p = 0,559				
Post-hoc-Test nach Scheffé								
	M 129	W 129	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2	M C57	W C57
M 129	0	0,37	8,03**	4,07**	5,35**	4,82**	15,62**	9,51**
W 129	0,37	0	11,86**	6,82**	8,50**	7,87**	20,82**	13,65**
M Hyb1	8,03**	11,86**	0	0,55	0,23	0,40	1,25	0,06
W Hyb1	4,07**	6,82**	0,55	0	0,07	0,01	3,35**	0,97
M Hyb2	5,35**	8,50**	0,23	0,07	0	0,02	2,52*	0,53
W Hyb2	4,82**	7,87**	0,41	0,01	0,02	0	3,09**	0,79
M C57	15,62**	20,82**	1,25	3,35**	2,52*	3,09**	0	0,75
W C57	9,51**	13,65**	0,06	0,97	0,53	0,79	0,75	0
Ein-Weg-ANOVA Aufrichten ohne Beachtung des Geschlechts								
Faktor Genotyp	F _{3,153} = 70,12			p < 0,001				
Post-hoc Test nach Scheffé								
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2	C57BL/6				
129S1/SvImJ	0	33,37**	29,0**	64,88**				
Hyb1	33,37**	0	0,18	4,73**				
Hyb2	29,0**	0,18	0	6,86**				
C57BL/6	64,88**	4,73**	6,86**	0				
** p<0,01 * p<0,05								

Tab. 7: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für das Verhalten im *Open Field*: Putzdauer (M = Männchen, W = Weibchen, 129 = 129S1/SvImJ, C57 = C57BL/6JOLA Hsd)

Zwei-Weg-ANOVA Putzen										
Faktor Genotyp					$F_{3,149} = 6,10$		$p < 0,001$			
Faktor Geschlecht					$F_{1,149} = 1,86$		$p = 0,1749$			
Interaktion der Faktoren					$F_{3,149} = 2,68$		$p < 0,05$			
Post-hoc-Test nach Scheffé										
	M	W	M	W	M	W	M	W		
	129	129	Hyb1	Hyb1	Hyb2	Hyb2	C57	C57		
M 129	0	0,04	0,74	0,86	2,58*	0,21	0,10	0,02		
W129	0,04	0	0,43	0,53	1,97	0,07	0,01	0,002		
M Hyb1	0,74	0,43	0	0,01	0,57	0,16	0,29	0,50		
W Hyb1	0,86	0,53	0,01	0	0,42	0,23	0,38	0,61		
M Hyb2	2,58*	1,97	0,57	0,42	0	1,33	1,66	2,12*		
W Hyb2	0,21	0,07	0,16	0,23	1,33	0	0,02	0,09		
M C57	0,10	0,01	0,29	0,38	1,66	0,02	0	0,03		
W C57	0,02	0,002	0,50	0,61	2,12*	0,09	0,03	0		
Ein-Weg-ANOVA Putzen ohne Beachtung des Geschlechts										
Faktor Genotyp					$F_{3,153} = 5,76$		$p < 0,001$			
Post-hoc Test nach Scheffé										
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2	C57BL/6						
129S1/SvImJ	0	2,82*	3,80*	0,08						
Hyb1	2,82*	0	0,07	1,95						
Hyb2	3,80*	0,07	0	2,78*						
C57BL/6	0,08	1,95	2,78*	0						
** p<0,01 * p<0,05										

Tab. 8: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Anzahl der Kotboli im *Open Field* (M = Männchen, W = Weibchen, 129 = 129S1/SvImJ, C57 = C57BL/6JOLA Hsd)

Zwei-Weg-ANOVA Anzahl der Kotboli								
Faktor Genotyp	F _{3,144} = 31,76				p < 0,001			
Faktor Geschlecht	F _{1,144} = 12,33				p < 0,001			
Interaktion der Faktoren	F _{3,144} = 2,35				p = 0,0745			
Post-hoc-Test nach Scheffé								
	M	W	M	W	M	W	M	W
	129	129	Hyb1	Hyb1	Hyb2	Hyb2	C57	C57
M 129	0	0,07	0,91	0,002	0,81	0,21	1,16	5,60**
W129	0,01	0	0,76	0,02	0,68	0,14	1,35	6,00**
M Hyb1	0,91	0,76	0	0,96	0,001	0,25	4,14**	11,03**
W Hyb1	0,002	0,02	0,96	0	0,85	0,24	1,001	5,08**
M Hyb2	0,81	0,68	0,001	0,85	0	0,23	3,53**	9,28**
W Hyb2	0,21	0,14	0,25	0,24	0,23	0	2,36*	7,97**
M C57	1,16	1,35	4,14**	1,001	3,53**	2,36*	0	1,66
W C57	5,60**	6,00**	11,03**	5,08**	9,28**	7,97**	1,66	0
Ein-Weg-ANOVA Anzahl der Kotboli ohne Beachtung des Geschlechts								
Faktor Genotyp	F _{3,153} = 29,17				p < 0,001			
Post-hoc Test nach Scheffé								
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2	C57BL/6				
129S1/SvImJ	0	0,78	1,56	13,11**				
Hyb1	0,78	0	0,15	19,88**				
Hyb2	1,56	0,15	0	22,27**				
C57BL/6	13,11**	19,88**	22,27**	0				
** p<0,01 * p<0,05								

Olfaktorische Wiedererkennung

Tab. 9: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Untersuchung der Investigationsdauer während des *Samplings* des Versuchs *Sampling* direkt – *Choice* direkt

Zwei-Weg-ANOVA Untersuchungszeit <i>Sampling</i>						
Faktor Genotyp	F _{2,114} = 55,0		p < 0,001			
Faktor Geschlecht	F _{1,114} = 44,83		p < 0,001			
Interaktion der Faktoren	F _{2,114} = 1,27		p = 0,2852			
Post-hoc Test nach Scheffé						
	M 129S1	W 129S1	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2
M 129S1	0	2,19	0,52	0,54	13,87**	1,76
W 129S1	2,19	0	4,51**	0,48	24,87**	7,29**
M Hyb1	0,52	4,51**	0	1,94	8,42**	0,34
W Hyb1	0,54	0,48	1,94	0	17,8**	3,86**
M Hyb2	13,87**	24,87**	8,42**	17,8**	0	5,37**
W Hyb2	1,76	7,29**	0,34	3,86**	5,37**	0
Ein-Weg-ANOVA Untersuchungszeit ohne Beachtung des Geschlechts						
Faktor Genotyp	F _{2,117} = 38,91		p < 0,001			
Post-hoc Test nach Scheffé						
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2			
129S1/SvImJ	0	1,66	35,64**			
Hyb1	1,66	0	20,70**			
Hyb2	35,64**	20,70**	0			
** p < 0,01 * p < 0,05						

Tab. 10: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Untersuchung der Gesamtinvestigationsdauer während des *Choice* für den Versuch *Sampling* direkt – *Choice* direkt

Zwei-Weg-ANOVA Gesamtinvestigationsdauer <i>Choice</i>						
Faktor Genotyp			$F_{2,114} = 28,48$	$p < 0,001$		
Faktor Geschlecht			$F_{1,114} = 4,3$	$p < 0,05$		
Interaktion der Faktoren			$F_{2,114} = 3,22$	$p < 0,05$		
Post-hoc Test nach Scheffé						
	M 129S1	W 129S1	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2
M 129S1	0	0,072	0,13	0,03	8,72**	2,43*
W 129S1	0,07	0	0,01	0,18	6,74**	1,56
M Hyb1	0,13	0,01	0	0,25	6,13**	1,31
W Hyb1	0,03	0,18	0,25	0	8,68**	2,67*
M Hyb2	8,72**	6,74**	6,13**	8,68**	0	1,82
W Hyb2	2,43*	1,56	1,31	2,67*	1,82	0
** p < 0,01 * p < 0,05						

Tab. 11: Darstellung der ANOVA-Werte für die Untersuchung der olfaktorischen Wiedererkennung für den Versuch *Sampling* direkt – *Choice* direkt

Zwei-Weg-ANOVA olfaktorische Wiedererkennung		
Faktor Genotyp	$F_{2,114} = 0,06$	$p = 0,945$
Faktor Geschlecht	$F_{1,114} = 2,04$	$p = 0,1556$
Interaktion der Faktoren	$F_{2,114} = 2,25$	$p = 1,1106$

Tab. 12: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Untersuchung der Aggressivität während des *Samplings* im Versuch *Sampling* direkt – *Choice* direkt

Zwei-Weg-ANOVA Aggressivität						
Faktor Genotyp			$F_{2,114} = 8,07$	$p < 0,001$		
Faktor Geschlecht			$F_{1,114} = 0,26$	$p = 0,6146$		
Interaktion der Faktoren			$F_{2,114} = 6,96$	$p < 0,01$		
Post-hoc Test nach Scheffé						
	M 129S1	W 129S1	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2
M 129S1	0	1,4	0,266	0,8	0,02	1,16
W 129S1	1,4	0	0,43	0,07	1,06	4,73**
M Hyb1	0,27	0,43	0	0,15	0,14	2,37*
W Hyb1	0,8	0,07	0,15	0	0,56	3,54**
M Hyb2	0,02	1,06	0,14	0,56	0	1,35
W Hyb2	1,16	4,73**	2,37*	3,54**	1,35	0
** p < 0,01 * p < 0,05						

Tab. 13: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Untersuchung der Investigationsdauer während des *Samplings* des Versuchs *Sampling* indirekt – *Choice* direkt

Zwei-Weg-ANOVA Untersuchungszeit <i>Sampling</i>						
Faktor Genotyp			$F_{2,115} = 39,84$	$p < 0,001$		
Faktor Geschlecht			$F_{1,115} = 0,07$	$p = 0,7858$		
Interaktion der Faktoren			$F_{2,115} = 1,51$	$p = 0,2253$		
Post-hoc Test nach Scheffé						
	M 129S1	W 129S1	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2
M 129S1	0	0,09	0,01	0,37	7,07**	6,01**
W 129S1	0,09	0	0,04	0,76	8,18**	7,08**
M Hyb1	0,01	0,04	0	0,47	7,12**	6,09**
W Hyb1	0,37	0,76	0,47	0	3,66**	2,95*
M Hyb2	7,07**	8,18**	7,12**	3,66**	0	0,04
W Hyb2	6,01**	7,08**	6,09**	2,95*	0,04	0
Ein-Weg-ANOVA Untersuchungszeit ohne Beachtung des Geschlechts						
Faktor Genotyp			$F_{2,118} = 40,28$	$p < 0,001$		
Post-hoc Test nach Scheffé						
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2			
129S1/SvImJ	0	0,69	35,17**			
Hyb1	0,69	0	24,35**			
Hyb2	35,17**	24,35**	0			
** p < 0,01 * p < 0,05						

Tab. 14: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Untersuchung der Gesamtinvestigationsdauer während des *Choice* des Versuchs *Sampling* indirekt – *Choice* direkt

Zwei-Weg-ANOVA Gesamtinvestigationsdauer <i>Choice</i>						
Faktor Genotyp	F _{2,115} = 19,79		p < 0,001			
Faktor Geschlecht	F _{1,115} = 16,91		p < 0,001			
Interaktion der Faktoren	F _{2,115} = 32,53		p < 0,001			
Post-hoc Test nach Scheffé						
	M 129S1	W 129S1	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2
M 129S1	0	1,33	0,1	1,54	11,07**	0,14
W 129S1	1,33	0	0,7	5,23**	18,77**	0,57
M Hyb1	0,08	0,7	0	2,17	12,23**	0,01
W Hyb1	1,54	5,23**	2,17	0	3,73**	2,41*
M Hyb2	11,07**	18,77**	12,23**	3,73**	0	12,8**
W Hyb2	0,14	0,59	0,01	2,41*	12,8**	0
** p < 0,01 * p < 0,05						

Tab. 15: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Untersuchung der olfaktorischen Wiedererkennung im Versuch *Sampling* indirekt – *Choice* direkt

Zwei-Weg-ANOVA olfaktorische Wiedererkennung						
Faktor Genotyp	F _{2,115} = 2,01		p = 0,1388			
Faktor Geschlecht	F _{1,115} = 0,12		p = 0,7334			
Interaktion der Faktoren	F _{2,115} = 3,35		p < 0,05			
Post-hoc Test nach Scheffé						
	M 129S1	W 129S1	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2
M 129S1	0	0,04	0,02	0,81	0,004	0,24
W 129S1	0,045	0	0,01	1,14	0,07	0,07
M Hyb1	0,015	0,01	0	0,97	0,03	0,13
W Hyb1	0,81	1,14	0,97	0	0,65	1,78
M Hyb2	0,004	0,07	0,03	0,65	0	0,29
W Hyb2	0,24	0,07	0,13	1,78	0,29	0
** p < 0,01 * p < 0,05						

Tab. 16: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Untersuchung der Investigationsdauer während des *Samplings* des Versuchs *Sampling* indirekt – *Choice* indirekt

Zwei-Weg-ANOVA Untersuchungszeit <i>Sampling</i>						
Faktor Genotyp	$F_{2,11} = 36,99$		$p < 0,001$			
Faktor Geschlecht	$F_{1,114} = 0,34$		$p = 0,5586$			
Interaktion der Faktoren	$F_{2,114} = 2,04$		$p = 0,1349$			
<i>Post-hoc</i> Test nach Scheffé						
	M 129S1	W 129S1	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2
M 129S1	0	0,02	5,00**	7,01**	6,78**	3,18*
W 129S1	0,02	0	5,35**	7,37**	7,14**	3,5**
M Hyb1	5,00**	5,35**	0	0,21	0,13	0,2
W Hyb1	7,01**	7,37**	0,21	0	0,01	0,8
M Hyb2	6,78**	7,14**	0,13	0,01	0	0,64
W Hyb2	3,18*	3,5**	0,2	0,8	0,64	0
Ein-Weg-ANOVA Untersuchungszeit ohne Beachtung des Geschlechts						
Faktor Genotyp	$F_{2,117} = 37,10$		$p < 0,001$			
<i>Post-hoc</i> Test nach Scheffé						
	129S1/SvImJ	Hyb1	Hyb2			
129S1/SvImJ	0	30,10**	24,59**			
Hyb1	30,11**	0	0,34			
Hyb2	24,59**	0,34	0			
** $p < 0,01$ * $p < 0,05$						

Tab. 17: Darstellung der ANOVA-Werte und Ergebnisse der Post-hoc-Analyse für die Untersuchung der Gesamtinvestigationsdauer während des *Choice* im Versuch *Sampling* indirekt – *Choice* indirekt

Zwei-Weg-ANOVA Gesamtinvestigationsdauer <i>Choice</i>						
Faktor Genotyp	$F_{2,113} = 18,75$		$p < 0,001$			
Faktor Geschlecht	$F_{1,113} = 0,78$		$p = 0,380$			
Interaktion der Faktoren	$F_{2,113} = 8,32$		$p < 0,001$			
Post-hoc Test nach Scheffé						
	M 129S1	W 129S1	M Hyb1	W Hyb1	M Hyb2	W Hyb2
M 129S1	0	0,04	0,83	3,63**	6,51**	0,94
W 129S1	0,04	0	1,19	4,23**	7,24**	1,31
M Hyb1	0,83	1,19	0	1,02	2,56*	0,00
W Hyb1	3,63**	4,23**	1,02	0	0,27	0,91
M Hyb2	6,51**	7,24**	2,56*	0,27	0	2,38*
W Hyb2	0,94	1,31	0,00	0,92	2,38*	0
** p < 0,01 * p < 0,05						

Tab. 18: Zwei-Weg-ANOVA für die Untersuchung der olfaktorischen Wiedererkennung für den Versuch *Sampling* indirekt – *Choice* indirekt

Zwei-Weg-ANOVA olfaktorische Wiedererkennung		
Faktor Genotyp	$F_{2,113} = 1,44$	$p = 0,2407$
Faktor Geschlecht	$F_{1,113} = 0,50$	$p = 0,4801$
Interaktion der Faktoren	$F_{2,113} = 0,50$	$p = 0,6063$

Tab. 19: Drei–Weg–ANOVA Einfluss des Jungtiergeschlechts auf die Wiedererkennung in allen drei Teilversuchen (JTG = Jungtiergeschlecht, VTG = Versuchstiergeschlecht)

Versuch <i>Sampling</i> direkt – <i>Choice</i> direkt		
Faktor JTG	$F_{1,95} = 0,81$	$p = 0,3692$
Interaktion JTG mit dem Genotyp	$F_{2,95} = 1,65$	$p = 0,1966$
Interaktion JTG mit dem VTG	$F_{1,95} = 1,23$	$p = 0,2701$
Versuch <i>Sampling</i> indirekt – <i>Choice</i> direkt		
Faktor JTG	$F_{1,109} = 0,16$	$p = 0,689$
Interaktion JTG mit dem Genotyp	$F_{2,109} = 0,32$	$p = 0,7274$
Interaktion JTG mit dem VTG	$F_{1,109} = 3,40$	$p = 0,0677$
Versuch <i>Sampling</i> indirekt – <i>Choice</i> indirekt		
Faktor JTG	$F_{1,117} = 0,38$	$p = 0,5401$
Interaktion JTG mit dem Genotyp	$F_{2,117} = 0,31$	$p = 0,7373$
Interaktion JTG mit dem VTG	$F_{1,117} = 0,15$	$p = 0,7029$

Tab. 20: Zwei–Weg–ANOVA Einfluss des weiblichen Zyklus auf die olfaktorische Wiedererkennung

Zwei–Weg-ANOVA weiblicher Zyklus		
Faktor Versuch	$F_{2,161} = 0,55$	$p = 0,577$
Faktor Zyklus	$F_{1,161} = 0,01$	$p = 0,9372$
Interaktion der Faktoren	$F_{2,114} = 0,91$	$p = 0,4029$