

**„Klickertraining und dessen Auswirkungen auf das
Wohlbefinden der F1-Generation des Crl:CD1(ICR)
und des C57BL/6JRj Mausstamms“**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sandra Reichel

geb. am 01.11.1990 in Darmstadt

Mainz, 11.11.2024

Dekan:

1.Berichterstatter:

2.Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2025

"It is not the animals that need refinement, but rather our practices in handling and studying them." (Autor unbekannt)

INHALT

Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XVI
1. Einleitung	17
1.1 Die 3R Leitlinien: Replace, Reduce, Refine.....	17
1.1.1 Replacement (Verzicht).....	18
1.1.2 Reduction (Verringerung).....	19
1.1.3 Refinement (Verbesserung)	21
1.2 Geschichtlicher Aspekt und Grundlagen des Trainings	24
1.2.1 Law of Effects – Das Gesetz der Wirkung von Edward Thorndike.....	24
1.2.2 Klassische Konditionierung	25
1.2.3 Operante Konditionierung	26
1.3 Klickertraining – positiv verstärktes Training	29
1.3.1 Sekundärer (Klick) und primärer Verstärker (Belohnung) des Klickertrainings.....	30
1.4 Positiver Effekt des Klickertrainings	31
1.5 Die Labormaus - Mus Musculus.....	32
1.6 Einfluss von Stress auf die Labormaus	35
1.6.1 Einfluss von präpartalem Stress auf die postnatale Versorgung	38
1.6.2 Hormonkaskade ausgelöst durch eine Stressexposition	39
1.7 Glucocorticoid – Corticosteron	41
1.8 Quantitative Bestimmung des Stresshormons mittels Immunoassay.....	44
1.8.1 Corticosteron Nachweis mit enzymgekoppeltem Immunabsorptionstest (ELISA) von ENZO	45
1.9 Verhaltenstests bei Mäusen – Indikator für deren Wohlbefinden.....	46
1.9.1 Interaktionstest oder Test auf Interaktion (Tal)	47
1.9.2 Erhöhtes Pluslabyrinth Test (EPM).....	47
1.9.3 Offener Feld Test	47
1.9.4 Nestbauverhalten (NBT).....	48
1.9.5 Saccharose Präferenz Test (SPT).....	50

1.9.6	Schwimmtest (FST).....	51
1.10	Körpergewichtsmessung als Indikator für Wohlbefinden	51
2.	Zielsetzung – Hypothesen	53
3.	Material und Methode.....	60
3.1	Etische Stellungnahme	65
3.2	Versuchstiere, Haltung und Handhabung.....	65
3.3	Auszuchtstamm CD - 1® IGS (CrI:CD1(ICR))	66
3.4	Inzuchtstamm C57BL/6JRj.....	67
3.5	Versuchsablauf der Mütter: Protokoll A und B.....	67
3.6	Versuchsablauf der Nachkommen	68
3.7	Test auf Interaktion	69
3.8	Körpergewichtsmessung (KGW)	70
3.9	Präsentation der Belohnung (primär Verstärker)	70
3.10	Einführung des Klicks (sekundärer Verstärker)	71
3.11	Ablauf und Durchführung des Klickertrainings.....	74
3.12	Verhaltenstest.....	75
3.12.1	Elevated Plus Maze Test.....	75
3.12.2	Open Field Test.....	77
3.12.3	Nestbautest	79
3.12.4	Saccharose Präferenz Test	80
3.12.5	Erzwungener Schwimmtest	81
3.13	Blutentnahme.....	83
3.14	Corticosteron ELISA	84
3.15	Auswertung ELISA.....	86
3.16	Statistische Auswertung.....	90
4.	Ergebnisse	91
4.1	Erster Versuchsteil: 10 Minuten Klickereinführung mit einmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll A) des Auszuchtstammes CrI:CD1(ICR).....	91
4.1.1	Gewichtszunahme der Nachkommen während dem Klickertraining.....	91
4.1.2	Trainingserfolge der Nachkommen.....	92

4.1.3 Einfluss des Klickertrainings auf die Interaktionszeit mit dem Experimentator	93
4.1.4 Nestbauverhalten der Nachkommen.....	95
4.1.5 Auswirkung des Klickertrainings auf das Depressions-assoziierte Verhalten der Nachkommen (SPT & FST).....	95
4.1.6 Corticosteronbestimmung der Nachkommen	97
4.2 Zweiter Versuchsteil: 5 Minuten Klickereinführung mit einmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll A) des Auszuchtstammes Crl:CD1(ICR).....	99
4.2.1 Gewichtszunahme der Nachkommen während des Klickertrainings	99
4.2.2. Trainingserfolge der Nachkommen	100
4.2.3 Vergleich der Trainingserfolge der Nachkommen mit einer Klickereinführungszeit von 5 und 10 Minuten.....	102
4.2.4 Einfluss des Klickertrainings auf die Interaktionszeit mit dem Experimentator	103
4.2.5 Auswirkung des Klickertrainings auf das Angst-assoziierte Verhalten der Nachkommen (EPM & OF).....	105
4.2.6 Nestbauverhalten der Nachkommen.....	109
4.2.7 Auswirkung des Klickertrainings auf das Depressions-assoziierte Verhalten der Nachkommen (SPT & FST).....	109
4.2.8 Corticosteronbestimmung der Nachkommen	111
4.3 Dritter Versuchsteil: 5 Minuten Klickereinführung mit zwei Trainingseinheiten der Mütter (Protokoll B) des Auszuchtstammes Crl:CD1(ICR)	113
4.3.1 Gewichtszunahme der Nachkommen während des Klickertrainings	113
4.3.2 Trainingserfolge der Nachkommen.....	114
4.3.3 Vergleich der Trainingserfolge der Nachkommen von einmal trainierten Müttern (Protokoll A) und zweimal trainierten Müttern (Protokoll B).....	115
4.3.4 Einfluss des Klickertrainings auf die Interaktionszeit mit dem Experimentator	117
4.3.5 Auswirkung des Klickertrainings auf das Angst-assoziierte Verhalten der Nachkommen (EPM & OF).....	119
4.3.6 Nestbauverhalten der Nachkommen.....	123
4.3.7 Auswirkung des Klickertrainings auf das Depressions-assoziierte Verhalten der Nachkommen (SPT & FST).....	124
4.3.8 Corticosteronbestimmung der Nachkommen	126

4.4	Vierter Versuchsteil: 10 Minuten Klickereinführung mit einmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll A) des Inzuchtstammes C57BL/6JRj.....	128
4.4.1	Gewichtszunahme der Nachkommen während des Klickertrainings.....	128
4.4.2	Trainingserfolge der Nachkommen.....	129
4.4.3	Vergleich der Trainingserfolge der Nachkommen vom Crl:CD1(ICR) mit den Nachkommen des C57BL/6JRj Stammes.....	130
4.4.4	Einfluss des Klickertrainings auf die Interaktionszeit mit dem Experimentator	131
4.4.5	Auswirkung des Klickertrainings auf das Angst-assoziierte Verhalten der Nachkommen (EPM & OF).....	132
4.4.6	Nestbauverhalten der Nachkommen.....	134
4.4.7	Auswirkung des Klickertrainings auf das Depressions-assoziierte Verhalten der Nachkommen (SPT & FST).....	135
4.4.8	Corticosteronbestimmung der Nachkommen	137
5.	Diskussion.....	139
5.1	Erster Versuchsteil: 10 Minuten Klickereinführung mit einmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll A) des Auszuchtstammes Crl:CD1(ICR).....	139
5.2	Zweiter Versuchsteil: 5 Minuten Klickereinführung mit einmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll A) des Auszuchtstammes Crl:CD1(ICR).....	144
5.3	Dritter Versuchsteil: 5 Minuten Klickereinführung mit zwei Trainingseinheiten der Mütter (Protokoll B) des Auszuchtstammes Crl:CD1(ICR)	155
5.4	Vierter Versuchsteil: 10 Minuten Klickereinführung mit einmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll A) des Inzuchtstamm C57BL/6JRj.....	164
6.	Schlussfolgerung.....	172
7.	Zusammenfassung.....	174
8.	Abstract.....	175
9.	Referenzen.....	176
10.	Publikationsliste.....	190
10.1	Präsentationen (oral):	190
10.2	Präsentation (Poster):.....	190
11.	Lebenslauf.....	191
12.	Danksagung.....	194

13. Versicherung.....196

14. Anhang.....197

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
&	Und
°	Winkelmaß
°C	Gradmaß, Temperatur in Celsius
µL	Mikroliter
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AP	Alkalische Phosphatase
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BL6	C57BL/6JRj, BL6 Inzuchtstamm
Blank	Lösung mit p-Npp Substrat (para-Nitrophenylphosphat)
bzw.	beziehungsweise
CD1	CrI:CD1(ICR)/CD-1® IGS, CD1 Auszuchtstamm
cm	Zentimeter
cm²	Quadratcentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CRFR1	Corticotropine-Releasing-Factor-Receptor Type 1, Corticotropine-Releasing-Hormone-Receptor Type 1
CRH/CRF	Corticotropin-Releasing Hormone/ Corticotropine-Releasing-Factor
d.h.	das heißt
etc.	et cetera , Abkürzung für weitere Aufzählungen wie „und so weiter“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay , enzymgekoppelter Immunabsorbtionstest
engl.	englisch
EPM	Elevated Plus Maze , Erhöhtes Pluslabyrinth (Verhaltenstest)
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FST	Forced Swim Test , erzwungener Schwimmtest (Verhaltenstest)
g	Gramm
GB	Gigabyte
HPA	Hypthalamic-pituitary-adrenal axis , Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
IH	Inhibitor Hormon
kg	Kilogramm

kHz	Kiloherz
KGW	Körpergewicht
Lux / lx	Einheit der Beleuchtungsstärke (die Menge an Licht, die auf eine Fläche von einem Quadratmeter fällt)
M-	<input type="checkbox"/> nicht trainierte Mütter
M+	<input checked="" type="checkbox"/> trainierte Mütter
MC2-R	Melanocortin-Typ2-Rezeptor
Min.	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
N-	<input type="checkbox"/> nicht trainierte Nachkommen
N+	<input checked="" type="checkbox"/> trainierte Nachkommen
NB	Negative Bestrafung
NBT	Nest Building Test, Nestbauerhaltenstest (Verhaltenstest)
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NSB	not specific bindingsites, nicht spezifische Bindungsstellen
NTP	Nichttechnische Projektzusammenfassung
NV	Negative Verstärkung
OF	Open Field Test, Test im offenen Feld (Verhaltenstest)
P14	Postnatal, 14 Tage nach Geburt
PB	Positive Bestrafung
pg	Pikogramm
PV	Positive Verstärkung
PVT (PRT)	Positiv verstärktes Training (positiv reinforcement training)
P-Wert	Signifikanzwert
PyRAT	Python- based Relational Animal Tracking, Software für Versuchstierhaltungen
RCF (x g)	Relative Zentrifugalkraft
RH	Releasing Hormone
RIA	Radioimmunoassay
rpm	runs per minute / Drehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDR	Steroid Displacement Reagenz
Sek./s	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler vom Mittelwert

SPT	Sucrose Preference Test, Sacharose Präferenz Test (Verhaltenstest)
TA	Total Activity, Gesamtaktivität
Tal	Test auf Interaktion, Verhaltenstest zur Bestimmung der Interaktion zwischen dem Tier und dem Experimentator (Verhaltenstest)
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Grundlagen der klassischen Konditionierung.	26
Abbildung 2: A Case History in Scientific Method, B. F. Skinner (1955).....	26
Abbildung 3: Operante Konditionierung: positive und negative Verstärkung sowie Bestrafung.	28
Abbildung 4: Zwei Mausstämme aus der klinischen Forschung.....	33
Abbildung 5: Gesamtanzahl der verwendeten Tiere für Tierversuche gemäß § 7 Abs. 2 TierSchG und zu wissenschaftlichem Zweck gemäß § 4 Abs. 3 TierSchG getöteten Tiere für das Meldejahr 2022.	35
Abbildung 6: Übersicht der Corticosteronausschüttung nach einem Stressreiz..	40
Abbildung 7: Syntheseweg von Corticosteron in der Nebennierenrinde.....	41
Abbildung 8: Graphische Darstellung eines kompetitiven, enzymgekoppelten Immunabsorbtiionstests..	46
Abbildung 9: Handhabungsmethoden zum Hochhebe der Mäuse.	66
Abbildung 10: Allgemeiner Versuchsablauf der Mütter. In Protokoll A werden die Mütter nur einmal trainiert. In Protokoll B werden die Mütter 14 Tage nach Geburt noch einmal trainiert.....	68
Abbildung 11: Allgemeiner Versuchsablauf der F1 Generation (Nachkommen) mit den Verhaltenstests.	69
Abbildung 12: Durchführung des Tests auf Interaktion und dessen Auswertung..	70
Abbildung 13: Die weiße Schokoladencreme (primärer Verstärker) von Brinkers (A) und der Klicker mit Target Stick (sekundärer Verstärker) von Trixi (B), welche für das Klickertraining genutzt werden. (Amazon, Zooplus)	71
Abbildung 14: Materialien für das Klickertraining.	72
Abbildung 15: Klickereinführung mit dem CD1 Stamm..	73
Abbildung 16: Ablauf vom Klickertraining auf der Intervallstoppuhr.....	74
Abbildung 17: Aufbau des Elevated Plus Maze Test.	76
Abbildung 18: Positionierung der Kamera und Einstellung des Lichtes, sowie die Platzierung der Maus. Der Tunnel mit der Maus sollte waagrecht maximal 3 cm auf dem offenen Arm des EPM liegen (A).....	77
Abbildung 19: Aufbau Open Field Box.....	78
Abbildung 20: Anpassungen des Hintergrundes je nach Fellfarbe der Maus.	79
Abbildung 21: Vorbereitung (A - F) und Auswertung (G/H) des Nestbauverhaltens.	80
Abbildung 22: Aufbau des Saccharose Präferenztests.	81

Abbildung 23: Der Aufbau vom Schwimmtest (FST, A).....	82
Abbildung 24: Blutentnahme durch Herzpunktion.	83
Abbildung 25: Verdünnungsreihe der Corticosteron Standards.	85
Abbildung 26: Berechnung des Mittelwertes von der gemessenen Absorption mittels Excel..	86
Abbildung 27: Übertragung der Mittelwerte der gemessenen Absorption.	87
Abbildung 28: Berechnung des Mean OD (-Blank).	87
Abbildung 29: Berechnung der Average Net OD.	88
Abbildung 30: Berechnung der Bindung des Cortikosterons in Prozent (Percent Bound).	88
Abbildung 31: Bestimmung der Formel zur Berechnung der Corticosteronkonzentration.....	89
Abbildung 32: Gewichtszunahme der Nachkommen in Prozent nach einmaligem Training der Mütter (Protokoll A, 10 Minuten).....	92
Abbildung 33: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten Crl:CD1(ICR) Nachkommen. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).....	93
Abbildung 34: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator des Crl:CD1(ICR) Stammes vor dem Klickertraining. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).....	94
Abbildung 35: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator des Crl:CD1(ICR) Stammes nach dem Klickertraining. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).	94
Abbildung 36: Nestbautest (Score) der Crl:CD1(ICR) Nachkommen nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).	95
Abbildung 37: Saccharose Präferenz in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A)..	96
Abbildung 38: Messung der Immobilität bei 1,5 % der Aktivitätsrate in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).....	97
Abbildung 39: Corticosteronbestimmung mittels ELISA des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).....	98
Abbildung 40: Gewichtszunahme der Nachkommen in Prozent nach einmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll A, 5 Minuten).	100
Abbildung 41: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten Crl:CD1(ICR) Nachkommen.	101
Abbildung 42: Häufigkeiten des Trainingsverhaltens der trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) mit einer Einführungszeit von 5 (blau) und 10 Minuten (schwarz).	103

Abbildung 43: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator der Nachkommen von trainierten und nicht trainierten Müttern des Crl:CD1(ICR) Stammes vor dem Klickertraining..	104
Abbildung 44: Ermittlung der Interaktionszeit der Nachkommen von trainierten und nicht trainierten Müttern des Crl:CD1(ICR) Stammes nach dem Klickertraining.....	105
Abbildung 45: Aufenthaltsdauer in den offenen Armen vom EPM des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A).	106
Abbildung 46: Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen (A), im Zentrum (B) sowie die Gesamtlaufstrecke (C) vom EPM des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A).	107
Abbildung 47: Aufenthaltsdauer im Zentrum des OF vom Crl:CD1(ICR) Stamm nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A).	108
Abbildung 48: Aufenthaltsdauer in der Peripherie (A) sowie die Gesamtlaufstrecke (B) vom OF des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A).....	108
Abbildung 49: Nestbautest (Score) des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A).....	109
Abbildung 50: Saccharose Präferenz in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A).	110
Abbildung 51: Messung der Immobilität bei 1,5 % der Aktivitätsrate in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A).....	111
Abbildung 52: Corticosteronbestimmung mittels ELISA des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A)..	112
Abbildung 53: Gewichtszunahme der Nachkommen in Prozent nach mehrmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll B, 5 Minuten).....	114
Abbildung 54: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten Crl:CD1(ICR) Nachkommen. Das Klickertraining der Mütter wurde zweimal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B).....	115
Abbildung 55: Vergleich der Trainingserfolge anhand trainierter Nachkommen von einmal trainierten Müttern (Protokoll A, grün) mit denen von zweimal trainierten Müttern (Protokoll B, schwarz) des Crl:ICR(CD1) Stammes.....	117
Abbildung 56: Ermittlung der Interaktionszeit der Nachkommen von trainierten und nicht trainierten Müttern des Crl:CD1(ICR) Stammes vor dem Klickertraining.....	118
Abbildung 57: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator der Nachkommen von trainierten und nicht trainierten Müttern des Crl:CD1(ICR) Stammes nach dem Klickertraining.	119

Abbildung 58: Aufenthaltsdauer in den offenen Armen vom EPM des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B).	120
Abbildung 59: Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen (A), dem Zentrum sowie die Gesamtlaufstrecke (B) vom EPM des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B).	121
Abbildung 60: Aufenthaltsdauer im Zentrum des OF vom Crl:CD1(ICR) Stamm nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B).	122
Abbildung 61: Aufenthaltsdauer in der Peripherie (A) sowie die Gesamtlaufstrecke (B) vom OF des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B).	123
Abbildung 62: Nestbautest (Score) des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B).	124
Abbildung 63: Saccharose Präferenz in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B).	125
Abbildung 64: Messung der Immobilität bei 1,5 % der Aktivitätsrate in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B).	126
Abbildung 65: Corticosteronbestimmung mittels ELISA des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B).	127
Abbildung 66: Gewichtszunahme der Nachkommen in Prozent nach einmaligem Klickertraining der Mütter des C57BL/6JRj Stammes (Protokoll A, 10 Minuten).	129
Abbildung 67: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten C57BL/6JRj Tieren.	130
Abbildung 68: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten Crl:CD1(ICR) und C57BL/6JRj Tieren.	131
Abbildung 69: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator vor und nach dem Klickertraining der Nachkommen des C57BL/6JRj Stammes.	132
Abbildung 70: Auswirkungen des Klickertrainings der Nachkommen (Beide Geschlechter) des C57BL/6JRj Stammes auf das erhöhte Pluslabyrinth nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).	133
Abbildung 71: Auswirkungen des Klickertrainings der Nachkommen auf die Aufenthaltsdauer im OF vom C57BL/6JRj Stamm nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).	134
Abbildung 72: Nestbautest (Score) des C57BL/6JRj Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).	135
Abbildung 73: Saccharose Präferenz in Prozent des C57BL/6JRj Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).	136

Abbildung 74: Messung der Immobilität bei 1,5 % der Aktivitätsrate in Prozent des C57BL/6JRj Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).....	137
Abbildung 75: Corticosteronbestimmung mittels ELISA des C57BL/6JRj Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A).	138
Abbildung 76: Ohrstanzenmarkierung.	197
Abbildung 77: Standardisiertes Haltungsfutter von ssniff und dessen Inhaltsstoffe.....	198
Abbildung 78: Protokollierung der Übersicht von den Nachkommen (F1).	199
Abbildung 79: Protokollierung des Körpergesichtes der Mäuse.	199
Abbildung 80: Protokollierung der Klickereinführung.	200
Abbildung 81: Protokollierung des Klickertrainings.	200
Abbildung 82: Protokollierung der Interaktionszeit mit dem Experimentator.....	201
Abbildung 83: Protokollierung der Gewichte der Flaschen mit dem Wasser und der 1 %igen Saccharoselösung.	201
Abbildung 84: Berechnung der Protokollierung der Gewichtsmessung von dem Saccharose Präferenztest.	202
Abbildung 85: Rechenbeispiel zum Ansetzen der 1 %igen Saccharoselösung.	202
Abbildung 86: Protokollierung des Nestbauverhaltenstests.	203
Abbildung 87: Corticosteron Assay Layout Vorlage.	204
Abbildung 88: Verdünnungstabelle für die Standards und das Pipettierschema.	205
Abbildung 89: Posterpräsentation (2021) von der 59. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) und der 20. Interessensgemeinschaft der Tierpfleger (IGTP).	206
Abbildung 90: Posterpräsentation (2023) von der 60. Wissenschaftlichen Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) und der 21. Interessensgemeinschaft der Tierpfleger (IGTP).	207

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Kontingenzschema.	27
Tabelle 2: Materialliste.....	60
Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf der Einführung des sekundären Verstärkers.....	73
Tabelle 4: Zusammenfassung des Klickertrainings ab dem vierten Tag.	74
Tabelle 5: Zeitliche Abfolge der Verhaltenstests.....	75

1. EINLEITUNG

In dieser Arbeit steht die Untersuchung des Klickertrainings und dessen Auswirkungen auf die F1-Generation im Fokus. Die Grundlagenforschung hat enorme Fortschritte in den letzten Jahren gemacht, unter anderem im Bereich der Entwicklung für tierversuchsfreie Methoden. Tierversuche werden in der heutigen Zeit stark kritisiert und sorgen immer wieder für Schlagzeilen in der Öffentlichkeit. Es gibt viele Vereine, die sich für eine tierfreie Forschung einsetzen. Diese argumentieren unter anderem damit, dass die Ergebnisse, welche anhand eines Tiermodells gewonnen werden, nicht auf den Menschen übertragbar und nicht reproduzierbar sind. Allerdings würde es den heutigen Wissenstand nicht geben, hätte es keine Tierversuche gegeben. Zu Beginn der Wissenschaft, stand ganz klar der Kenntnisgewinn im Mittelpunkt.

*„We may infer that our domestic animals were originally chosen ...
because they were useful...”
(Russel & Burch, 1959)*

Das Denken der Menschen hat sich mit den Jahren verändert und das Tierwohl von Versuchstieren rückt immer weiter in den Vordergrund. Alternative Methoden, welche Tierversuche ersetzen sollen, gewinnen immer mehr an Bedeutung. Das Bundesamt für Justiz hat viele Gesetze erlassen um das Wohlbefinden der Tiere zu schützen. Es liegt in der Verantwortung des Menschen das Tier als Mitgeschöpf vor unnötigen Schmerzen, Leiden und Schäden zu bewahren (Tierschutzgesetz [TierSchG] § 1). Diesen Gedanken verfolgten auch der Zoologe William Russel und der Mikrobiologe Rex Burch. „The Principles of Human Experimental Technique“ (W. M. S. Russell, 1959) ist der Titel ihres Buches, welches sie 1959 schrieben und in welchem sie zum ersten Mal ihr 3R Prinzip schildern.

1.1 DIE 3R LEITLINIEN: REPLACE, REDUCE, REFINE

Die 3Rs stehen für den Verzicht (replace) auf Tierversuche, die Verringerung (reduce) der Tieranzahl in Versuchen und die Verbesserung (refine) von Schmerzen, Leiden und Schäden an Versuchstieren durch weniger belastende Versuche. In Anlehnung daran entstand am 24. November 1986 die erste Richtlinie der europäischen Gemeinschaft (86/609/EWG) (Gemeinschaft, 24.11.1986). Diese Richtlinie dient dem Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere in Versuchen auf europäischer Ebene. Nach dem Erlass dieser Richtlinie gab es einige Unterschiede in der Rechts- und Verwaltungsvorschrift zwischen den

Mitgliedstaaten. Einige hatten ein hohes Schutzniveau für die Tiere, wohingegen andere Mitgliedstaaten nur die Mindestanforderungen erfüllten. Durch eine Angleichung der Gesetzgebung sollten diese Unterschiede zwischen den Mitgliederstaaten beseitigt werden. Am 22. September 2010 wurde deshalb die Richtlinie 86/609/EWG durch den Erlass der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates der europäischen Union abgelöst (Europäische Parlament and Union, 2010). So wurde das 3R Prinzip über die Richtlinie 2010/63/EU in nationales Recht implementiert. Nicht nur auf nationaler Ebene gewinnt das 3R Prinzip immer mehr an Bedeutung, sondern auch auf internationaler Ebene. Es gibt bereits weit mehr als 30 Zentren weltweit, die sich für eine bessere Umsetzung der 3Rs einsetzen (Harrison, 2024). Jedes dieser 3R Zentren hat seinen eigenen Schwerpunkt wie z. B. Ersatzmethoden für Tiermodelle zu etablieren oder Verbesserungen in der Medikamentengabe für die Tiere zu entwickeln (Schalbetter et al., 2021). Aber eines haben sie alle gemeinsam, sie möchten die Menschen davon überzeugen, die Art und Weise zu überdenken und zu ändern, wie Versuche seit Jahrzehnten gemacht werden (Harrison, 2024).

1.1.1 REPLACEMENT (VERZICHT)

Der Schwerpunkt Replacement beschäftigt sich mit dem Verzicht von Tierversuchen indem diese durch tierfreie Alternativmethoden ersetzt werden. Wissenschaftliche Fragestellungen sollen durch den Einsatz von Zell- Gewebe- und Organkulturen (in-vitro) untersucht werden. Als Alternative dienen Mikroorganismen (SET, 2024) oder Organismen in frühen Entwicklungsstufen, z.B. Hühnerembryonen (in-ovo). Diese Hühnerembryonen empfinden bis einschließlich 12. Bebrütungstag keine Schmerzen, daher werden diese oft als Alternativmethode in der Forschung eingesetzt (Werner, 2024, Miebach et al., 2022). Einige wissenschaftliche Fragestellungen lassen sich auch mit Hilfe von menschlichen Proben, wie zum Beispiel Blut (Challa et al., 2023) erforschen. Um ganz auf menschliche und tierische Proben zu verzichten, können Computermodelle (in-silico) eingesetzt werden. Computermodelle haben einige Vorteile gegenüber in-vitro Modellen (SET, 2024). So nutzt eine Forschergruppe in New York das maschinelle Lernen mithilfe von künstlicher Intelligenz dazu, die überlebensfähigen Embryonen zu bestimmen. Denn nur diese werden bei einer künstlichen Befruchtung (In-vitro-Fertilisation) transferiert und implantiert (Barnes et al., 2023). Eine andere Gruppe nutzt ein mathematisches Computermodell (Deep-Learning-Model), um das Wachstum von Hirntumoren mit Hilfe von vorherigen magnetresonanztomographischen Aufnahmen (Bildgebungen) vorherzusagen. Das Verfahren beruht auf der Bestimmung der Diffusivität und der Proliferationsrate von Tumorzellen. Anhand dieser Parameter kann die künstliche Intelligenz eine Vorhersage über das Wachstum der Tumore machen. Dies ermöglicht eine effektivere Therapiemöglichkeit (Meaney et al., 2023). Eine weitere

Ersatzmöglichkeit von Versuchstieren ist die Anwendung von Dummies für Schulungszwecke in der Aus-, Fort- und Weiterbildung. Ein Beispiel dafür ist die Anwendung von therapeutischen Nanopartikeln in der Krebsforschung. Die Behandlung von Pankreaskarzinomen mit magnetischen Nanopartikeln durch Hyperthermie und lokaler Wirkstofffreisetzung ist ein schwierigeres Verfahren. Die magnetischen Nanopartikel werden über ein Endoskop in den Magen eingebracht. Danach muss ein magnetischer Speicher an der Magenwand mit Schleifen und Klips fixiert werden. Mithilfe dieses Speichers wird ein magnetisches Feld erzeugt, das die Nanopartikel am Tumor platziert. Um dieses Verfahren zu erlernen, wurde ein 3-D-Modell anhand computertomographischer Bilder des menschlichen Pankreas gedruckt. Anhand dieses Modells kann die richtige Platzierung der Nanopartikel geübt werden, ohne dafür tierisches Gewebe zu nutzen (Roeth et al., 2021). Es gibt zahlreiche andere wissenschaftliche Gruppen, die an Alternativmethoden forschen, um Tierversuche zu vermeiden. In einigen Forschungsgebieten muss tierisches Gewebe noch genutzt werden. Eine tierfreie Alternative dazu bietet die Organchip-Technologie. Bei der Organchip-Technologie werden gespendete Zellen von Patienten auf Kunststoff Chips aufgebracht und kultiviert. Die häufigste Anwendung findet im Bereich der Medikamententestung statt. Ein Biotechnologieunternehmen aus Jena nutzt diese Methode z. B., um die pathogene Wirkung eines Hefepilzes (*Candida albicans*) auf den Darm zu untersuchen. Für diese Untersuchung wurden zu dem Hefepilz und den Darmzellen noch Immunzellen auf den Chip aufgebracht, um den Entzündungsprozess und den Schweregrad der Infektion bewerten zu können. Zudem wurde die Wirkung des Antimykotikums (Caspofungin) auf verschiedene Erregerstämme des Hefepilzes bewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit dem Antimykotikum die Vermehrung und die Ausbreitung des Erregers reduzierte. Eine Infektion kann dadurch verhindert werden. Diese Ergebnisse zeigen großes Potenzial in der Organchip-Technologie und in der tierfreien Testung von Medikamenten (Kaden et al., 2024). In diesem Abschnitt wurden bereits einige tierfreie Methoden erwähnt, jedoch gibt es weit mehr. Datenbanken wie SMAFIRA oder NAT-Database liefern weitere Informationen über Alternativmethoden.

1.1.2 REDUCTION (VERRINGERUNG)

Die Anzahl an Versuchen, sowie die dafür verwendeten Tiere soll auf ein Minimum verringert werden. Die Tierschutz-Versuchstierverordnung (§ 31 Abs. (1) 1c)) fordert eine wissenschaftliche Rechtfertigung der Art, der Herkunft, des Lebensabschnittes und der geschätzten Anzahl der für das Versuchsvorhaben vorgesehene Tiere darzulegen. Dafür ist eine sorgfältige statistische Planung notwendig. Es gibt zahlreiche Hilfsmittel zur Berechnung der Versuchsvorhaben, wie z. B. der Experimental Design Assistant (Assistant, 2024) oder der ein Programm zur Berechnung der Stichprobengröße (G*Power) (Düsseldorf, 2024). Diese

Plattformen bieten Wissenschaftlern eine Hilfe, ihre Experimente optimal zu planen. In manchen Fällen empfiehlt es sich von Fachleuten (statistische Beratungsstellen) beraten zu lassen. Eine weitere Möglichkeit, Tierzahlen zu verringern ist die Verwendung von bildgebenden Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie (CT). Hierbei können Tiere ohne invasive Eingriffe untersucht werden. Es können mehrere Bilder zu verschiedenen Zeitpunkten von nur einem Tier aufgenommen werden. Dadurch können Veränderungen im Gewebe (z. B. Tumore) erkannt werden, ohne dass das Tier dafür euthanasiert wird. Außerdem bietet diese Technik die Möglichkeit Substanzen zu testen und ihre direkten Auswirkungen zu beobachten. Das Deutsche Primatenzentrum in Göttingen befasst sich seit 2015 mit der funktionellen Bildgebung und führt diverse Forschungsprojekte durch, deren Ziel es ist, zukünftig weniger Tiere im Versuch verwenden zu müssen (Primatenzentrum, 2024). Eine weitere Methode die zur Reduktion von Tierzahlen beiträgt, ist die Kryokonservierung von Mauslinien, die aktuell oder zeitweise keine wissenschaftliche Verwendung haben (Schenkel, 2006). Bei diesem Verfahren werden Spermien oder Embryonen von z.B. gentechnisch veränderten Mauslinien eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196° Grad gelagert (Whittingham et al., 1972). Wird die Mauslinie zu einem späteren Zeitpunkt wieder benötigt, werden die Spermien oder Embryonen revitalisiert. Die revitalisierten Embryonen werden anschließend in die Amme transferiert (Embryotransfer). Bei Spermien ist eine In-vitro Fertilisation nötig. Eine Kryokonservierung mit anschließender In-vitro Fertilisation und Embryotransfer ermöglicht es die Zuchten aufzulösen und erst zu Versuchsbeginn wieder neu zu züchten. Das hat den Vorteil, dass die Mauslinien, die vorerst nicht mehr benötigt werden, nicht ohne Grund gezüchtet werden. Es werden keine überzähligen Tiere produziert und die Versuchstierzahl kann dadurch massiv reduziert werden (Schenkel, 2006, Guan et al., 2012). Ein weiterer wichtiger Beitrag zur Reduzierung der überzähligen Tiere ist die Verwendung beider Geschlechter in den Versuchen. In der biomedizinischen Forschung werden nach wie vor häufiger männliche als weibliche Tiere eingesetzt (Will et al., 2017). Die Begründung dafür ist, dass weibliche Tiere wegen ihrer Schwankungen im Hormonhaushalt keine zuverlässigen und reproduzierbaren Daten liefern. Diese Denkweise ist jedoch veraltet. Studien belegen, dass weibliche Tiere während des Östruszyklus im offenen Feld Test (OF) sogar weniger variable Ergebnisse liefern, als die männlichen Tiere (Levy et al., 2023). Ein weiterer Vorteil gegenüber den männlichen Tieren ist ihre unkomplizierte Haltung. Blutige oder sogar tödliche Auseinandersetzungen aufgrund von Revierkämpfen gibt es bei den weiblichen Tieren selten (Latham and Mason, 2004). Eine Einzelhaltung bei männlichen Tieren kann ab einem gewissen Alter mit hoher Wahrscheinlichkeit erforderlich werden. Die Einzelhaltung von weiblichen Tieren ist äußerst selten erforderlich, da sie auch im fortgeschrittenen Alter noch gut in Gruppen integrierbar sind und den sozialen Austausch innerhalb der Gruppe bevorzugen (Meijer et al., 2006). Trotz

dieser Vorkehrungen und Prüfungen werden dennoch Tiere in der Forschung euthanasiert. Nicht alle Organe werden immer für die Auswertung verwendet. Die Organe, die nicht verwendet werden, können auf Plattformen geteilt werden. So kann ein anderer Wissenschaftler sich die Organe beschaffen, ohne selber ein Tier dafür zu halten. Das Gleiche bezieht sich auch auf lebende Tiere. Die Tiere, die ein Versuchsvorhaben überleben, können freigegeben werden und mit anderen geteilt werden (Czubala et al., 2022).

1.1.3 REFINEMENT (VERBESSERUNG)

Die Forschungsarbeiten unter dem Thema Refinement beschäftigen sich mit der Verbesserung des Wohlbefindens der Tiere und der Verbesserung der Validität der Forschungsergebnisse. Dazu gehört nicht nur eine artgerechte Haltung mit ausreichend Platz nach der europäischen Richtlinie Anhang III Teil B. Artspezifischer Teil, Tabelle 1.1. (Europäische Parlament and Union, 2010), sondern auch die Minimierung von Angst, Leiden und Schmerzen, die durch eine Versuchsmethode verursacht werden. Eine Methode, die sich bewährt hat, ist das Anreichern eines Käfigs (sogenanntes Enrichment). Das Anreichern erfolgt über Gegenstände in allen möglichen Formen, Farben und Materialien. Dazu zählen diverse Unterschlupfmöglichkeiten (Häuser, Tunnel, usw.), verschiedene Nestbaumaterialien (Sizzle Nest, Tücher, usw.), Laufräder, Nagehölzer, Einstreu und vieles mehr. Es zeigte sich, dass Käfige, welche mit mehr Material angereicht waren, als die Standardkäfige, das Wohlbefinden der Tiere verbesserten. So haben die Tiere ihre natürlichen Verhaltensweisen (klettern, verstecken, Nestbau, springen, laufen, putzen, graben, soziale Interaktion usw.) intensiver ausgeübt (Key, 2004). Die Tiere in angereicherten Käfigen zeigen zudem ein reduziertes Angstverhalten, eine bessere Gehirnentwicklung und weniger abnormale Verhaltensweisen (Wolfer et al., 2004). Jedoch können diese Ergebnisse sehr stark variieren. Bei männlichen Mäusen wurde festgestellt, dass die Käfiggröße, sowie die Gruppengröße das Aggressionsverhalten beeinflussen können. Es empfiehlt sich daher die männlichen Tiere in einer Gruppengröße von 3-5 Tieren zu halten. Die Anzahl der Tiere sollte an die Käfiggröße angepasst sein (Van Loo et al., 2001). Im vorherigen Abschnitt wurde bereits erwähnt, dass die männlichen Tiere aufgrund der aggressiven Auseinandersetzungen jedoch oft einzeln gehalten werden müssen. Eine Möglichkeit, das daraus folgende Defizit an sozialem Kontakt zu verbessern, ist die Anreicherung mit genügend Nestbaumaterial (Van Loo et al., 2004). Ein weiteres Problem ist die Tatsache das es stammspezifischen Unterschiede gibt. Bei dem C57BL Stamm führten die Anreicherungen zu reaktiveren und aufmerksameren Mäusen, wohingegen die Tiere des BALB/c Stammes ein erhöhtes Maß an Angst zeigten (van de Weerd et al., 1994). Im Vergleich zu dem SWISS (RjOrl:SWISS) Stamm zeigen die C57BL/6JRj Mäuse aufgrund der Auswertungen des erhöhten Pluslabyrinths und des offenen Feld Tests,

Veränderungen im Verhalten in Abhängigkeit der Anreicherungen (Bailoo et al., 2018). Es wurden nicht nur stammspezifische Unterschiede nachgewiesen, sondern auch Unterschiede zwischen dem Geschlecht. In Abhängigkeit der Anreicherungen im Käfig zeigen die männlichen Tiere ein erhöhtes Maß an ängstlichem Verhalten (van de Weerd et al., 1994) wohingegen den weiblichen Tieren eine längere Laufstrecke und eine längere Aufenthaltsdauer in den Ecken im offenen Feld Test nachgewiesen wurde (Bailoo et al., 2018). Die Daten variieren sehr stark zwischen Geschlecht und Stamm und daher kann eine allgemein gültige Aussage über eine Empfehlung der Anreicherungen im Käfig nicht getroffen werden. Ein weiterer Faktor der berücksichtigt werden sollte, ist das durch die Anreicherung mit Nestbaumaterial die Entwicklung der Nachkommen verbessert werden (Leidinger et al., 2019). Durch eine größere Menge an Einstreu können die Tiere ihr natürliches Grabverhalten besser ausüben (Freymann et al., 2015). Die Ausübung natürlicher Verhaltensweisen führt zu einem verbesserten Wohlbefinden. Jedoch reichen Käfiganreicherungen alleine oft nicht aus und es kann mehr unternommen werden. Durch die Handhabung mit der Hand kann das Wohlbefinden der Mäuse deutlich verbessert werden. Das routinemäßige Hochheben der Labormäuse an der Schwanzbasis löst Stress- und Angstreaktionen bei der Maus aus, was zu Aversionen gegenüber dem Wissenschaftler führt. Hier wurde zum Hochheben der Tiere ein Tunnel sowie die Hand evaluiert. Die Handhabe von Mäusen mit Hilfe von Tunneln oder direkt durch die Hand zeigt eine deutliche Reduzierung des Angst-assoziierten Verhaltens der Tiere und eine gesteigerte Interaktion mit dem Experimentator im Vergleich zu der Handhabe am Schwanz. Dieser Unterschied zeigt sich sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Tieren bei verschiedenen Stämmen (BALB/c, C57BL/6 und ICR(CD1)) (Hurst and West, 2010, Gouveia and Hurst, 2013). Nicht in jedem Käfig ist aufgrund von Platzmangel immer die Option vorhanden, einen weiteren Tunnel hinzuzufügen. Dennoch profitieren die Tiere von der Tunnelhandhabung, auch wenn sie nicht mit ihrem eigenen, sondern einem fremden Tunnel hochgehoben werden. Es muss nicht zwangsläufig ein separater Tunnel für jeden individuellen Käfig genutzt werden (Gouveia and Hurst, 2013). Ein zeitlicher Mehraufwand, um die Tiere an den Tunnel zu gewöhnen, konnte widerlegt werden. Eine kurze Sequenz von nur 2 Sekunden genügt, um die Tiere an den Tunnel zu gewöhnen. Diese Gewöhnung kann während der routinemäßigen Käfigreinigung stattfinden ohne dass zusätzliche Zeit in Anspruch genommen wird (Gouveia and Hurst, 2019). Die Handhabe mit dem Tunnel hat einen weiteren Vorteil. In der biomedizinischen Forschung sind Injektionen üblich und werden häufig angewendet. Hierbei kann die Handhabe mit dem Tunnel die freiwillige Interaktionszeit mit dem Experimentator nach wiederholten subkutanen Injektionen stark verbessern. Auch das Angst-assoziierte Verhalten nach der Injektion kann durch die Tunnelhandhabung reduziert werden. Am Schwanz fixierte Mäuse interagieren nach der subkutanen Injektion kaum noch mit dem Experimentator und zeigen eine Steigerung des

Angst-assoziierten Verhaltens in Verhaltenstests. Die Tunnelhandhabung zeigte hier deutliche Verbesserungen des Wohlbefindens der Tiere mit minimalem Zeitaufwand (Gouveia and Hurst, 2019).

Ein weiterer wichtiger Aspekt zum Thema Refinement ist die Beurteilung und Behandlung von Schmerzen. Bei Nagetieren ist die Beurteilung des Gesundheitszustandes und des Wohlbefindens oft schwierig und führt zu Fehlern in der Interpretation ihres Verhaltens. Verschiedene psychologische und physiologischen Parameter dienen dazu, den Gesundheitszustand und den Grad des Wohlbefindens zu bestimmen. Zu den psychologischen Parametern zählen die Auswertungen des Verhaltens (Aktivität, Körperhaltung, Körperpflege, soziale Interaktion) der Tiere. Die physiologischen Parameter wie Herzfrequenz, Temperatur, Körpergewicht oder Hormone liefern ebenfalls Aussagen über den Gesundheitszustand und das Wohlbefinden (Rinwa et al., 2024). Je mehr Parameter berücksichtigt werden, desto genauer ist die Aussage über den Zustand der Tiere. Nach einem chirurgischen Eingriff oder Krankheitsmodell ist die Überwachung des Zustandes der Tiere unerlässlich. Sobald Abweichungen vom Normalzustand auftreten, muss entsprechend gehandelt werden. Videoaufzeichnungen ermöglichen es den Wissenschaftlern, eine 24 Stunden lange Überwachung durchzuführen, unabhängig vom Einfluss des Menschen. Dieser Einfluss könnte dazu führen, dass die Tiere andere Verhaltensweisen zeigen und der Gesundheitszustand falsch wahrgenommen wird (Kunczik et al., 2019). Die Überwachung des Heimatkäfigs (homecage monitoring) kann ebenfalls zur Bestimmung des Zustandes der Tiere dienen. Entsprechend entwickelte Monitoring-Käfige haben viele verschiedene Funktionen darunter die Bestimmung der Aktivität und des Aufenthaltsorts von Tieren (Grieco et al., 2021). Die digital Überwachung im Heimatkäfig (digital homecage monitoring – DHCM) ermöglicht es, mit Hilfe einer künstlichen Intelligenz einen Algorithmus zu entwickeln, der es möglich macht Verhaltensauffälligkeiten zu erfassen und mitzuteilen, ohne dass der Mensch einen direkten Einfluss auf die Tiere hat (iMouse). Eine sorgfältige Überwachung der Tiere ermöglicht eine angemessene Behandlung nach einem Eingriff. Dazu zählt die Anwendung und Dosierung von Arzneimitteln zur Schmerzlinderung und somit zur Verbesserung des Wohlbefindens. Buprenorphin ist ein häufig verwendetes Schmerzmittel bei Mäusen (Rudeck et al., 2020). Dies wird alle 4-8 Stunden subkutan injiziert (Jirkof et al., 2015). Für die Applikation des Schmerzmittels muss das Tier kurzzeitig fixiert werden. Dies bedeutet jedoch wieder Stress für das Tier. Eine gute Refinementmethode ist es also, dem Tier die Medikamente zu applizieren ohne es dafür zu fixieren. Das Gleiche betrifft auch die Probenentnahmen z. B. Blut aus der Schwanzvene. Dafür bietet sich ein weicher Untergrund (z. B. VetBet) an, an dem sich die Tiere festhalten können. So kann dem Tier etwas appliziert oder entnommen werden, ohne es dafür zu fixieren. (Rinwa et al., 2024). Ein solcher minimaler Eingriff hat den Vorteil, dass er zudem noch das Infektionsrisiko minimiert. Bei der Verwendung einer oralen

Schlundsonde kommt es oft zu Verletzungen oder Reizungen im Rachenraum. Hier bietet es sich als Refinementmethode an die Applikation der Substanz mit einer Pipettenspitze durchzuführen. Zwar muss die Maus hierzu noch fixiert werden, aber es wird keine Sonde bis in den Magen eingeführt (Gulin et al., 2020). Das Klickertraining wird ebenfalls als Refinementstrategie zur Verbesserung des Tierwohls eingesetzt. Durch das Training kann unter anderem die Langeweile der Tiere reduziert werden, was zu einer Steigerung des Wohlbefindens führt (Mieske et al., 2022). Ein verbessertes Tierwohl führt zu einer längeren Interaktion mit dem Wissenschaftler und somit zu einem reduzierten Angst-assoziierten Verhalten (Gouveia and Hurst, 2019).

1.2 GESCHICHTLICHER ASPEKT UND GRUNDLAGEN DES TRAININGS

Das Klickertraining ist eine Methode, um ein gewünschtes Verhalten positiv zu verstärken. Der Klick (sekundärer Verstärker) soll ein bestimmtes Verhalten bestätigen und dient als zeitliche Überbrückung bis zur Belohnung (primärer Verstärker). Die Belohnung (z. B. Futterbelohnung) wird dazu benutzt, das Verhalten positiv zu verstärken, damit die Tiere dieses Verhalten öfter anbieten. In der heutigen Zeit findet die Form des Trainings nicht nur bei unseren Haustieren Anwendung, sondern auch in der Forschung. Hier wird es nicht nur bei Hunden (Cimarelli et al., 2021) und Katzen (Kogan et al., 2017) angewendet, sondern auch bei Hühnern (Mähli et al., 2023) oder Großtieren wie Schweinen (Paredes-Ramos et al., 2020) und sogar bei Affen (Gillis et al., 2012). Durch das Training ist es möglich, spontan und freiwillig gezeigte Verhaltensweisen zu verstärken, damit diese öfter wiederholt werden. Kaninchen, die mit dem Klicker trainiert werden, laufen freiwillig in eine Box zum Wiegen. Mittels dieser Box können die Tiere unkompliziert und stressfrei transportiert werden (Hohlbaum et al., 2024). Hühner, die trainiert werden, laufen freiwillig zur Blutentnahme wohingegen die untrainierten Hühner gefangen werden müssen (Mähli et al., 2023). Somit ist das Training eine geeignete Methode um Stress abzubauen, was gleichzeitig das Wohlbefinden steigert. Das Prinzip des Trainings basiert auf der Grundlage der Konditionierung. Den Grundstein dafür legten diverse Forscher des Behaviorismus fest, wie Edward Lee Thorndike, Iwan Petrowitsch Pavlov und Burrhus Frederic Skinner.

1.2.1 LAW OF EFFECTS – DAS GESETZ DER WIRKUNG VON EDWARD THORNDIKE

Edward Thorndike (1874 – 1949) forschte in seiner Dissertation über die Intelligenz der Tiere. Seine Forschung fokussierte sich auf Verhaltensstudien von Katzen, Hunden und Hühnern (Woodworth, 1950). Er stellte die Theorie vom "Lernen durch Versuch und Irrtum" („*trial and*

error“) mit zufälligem Erfolg auf. Um dies zu prüfen, sperrte er hungrige Katzen in eine Box. Die Box ließ sich durch das Bestätigen von komplexen Mechanismen wie Hebeln, Knöpfen und Riegeln öffnen. Hatten die Tiere das geschafft, wurden die Tiere mit Futter belohnt. Um ausschließen zu können, dass es sich hier um einen zufälligen Erfolg handelt, wiederholte er den Versuch und erstellte eine Lernkurve. Er bemerkte, dass die Zeitspanne bis zum Erfolg stetig abnahm. Er erklärte dies damit, dass das Entkommen aus der Box durch das Futter verstärkt wurde. Auf diesem Erkenntnisgewinn basierte seine Lerntheorie: „*Law of Effects*“. Erfolgt auf eine Reaktion eine positive Konsequenz (Futter), dann werden die Situation (Reiz) und die Reaktion gefestigt bzw. verstärkt. Tritt diese Situation (Reiz) noch einmal auf, wird die Reaktion mit einer größeren Wahrscheinlichkeit wiederholt. Tritt jedoch eine negative Konsequenz auf eine Reaktion, wird diese weniger gezeigt („*Negativ Law of Effects*“) (Brown, 1912).

Edward Thorndike wurde somit zu einem Begründer des Behaviorismus. Auf dessen Grundlage beruhen die Theorien von F. B. Skinner über die operante Konditionierung. Nicht nur die Theorie der operanten Konditionierung trägt zu einem grundlegenden Verständnis des Lernprozesses bei, sondern auch die Forschung von Iwan Pavlov zur klassischen Konditionierung, welche er zur gleichen Zeit, wie Thorndike, begann. Zusammen legten sie die theoretischen Grundlagen für das Verständnis des Lernprozesses fest.

1.2.2 KLASSISCHE KONDITIONIERUNG

Iwan Pavlov war ein russischer Physiologe, der durch seine Forschung über den klassischen Konditionierungsprozess berühmt wurde. In seinem Experiment mit den Hunden fand er heraus, dass sie nach wiederholtem Vorzeigen eines neutralen Reizes (Glockenton) und eines unconditionierten Reizes (Futter) schließlich begannen, auf den neutralen Reiz mit einer konditionierten Reaktion (Speichelfluss) zu reagieren (Abbildung 1)(Pavlov, 1927).



Abbildung 1: Grundlagen der klassischen Konditionierung. Vor der Konditionierung löst ein unkonditionierter Stimulus (UCS) automatisch eine unkonditionierte Reaktion (UCR) aus. Ein neutraler Stimulus (NS), z. B. ein Ton, löst hingegen keine Reaktion aus. Während der Konditionierung wird der konditionierte (Ton) mit dem unkonditionierten Stimulus (Futter) in Verbindung gebracht. Durch diese Verbindung wird ein neutraler Stimulus zu einem konditionierten Stimulus und löst eine konditionierte Reaktion (Speichelfluss) aus. Diese ist der unkonditionierten Reaktion (UCR) ähnlich (Erstellt mit BioRender.com).

1.2.3 OPERANTE KONDITIONIERUNG

B. F. Skinner war ein amerikanischer Psychologe, welcher das Verständnis der Lernprozesse durch seine Forschung zur operanten Konditionierung erweiterte. Seine Forschung basiert auf den Grundlagen von der Theorie von E. L. Thorndike „*Law of Effects*“. Skinner zeigte, dass das Verhalten durch Konsequenzen geformt werden kann.

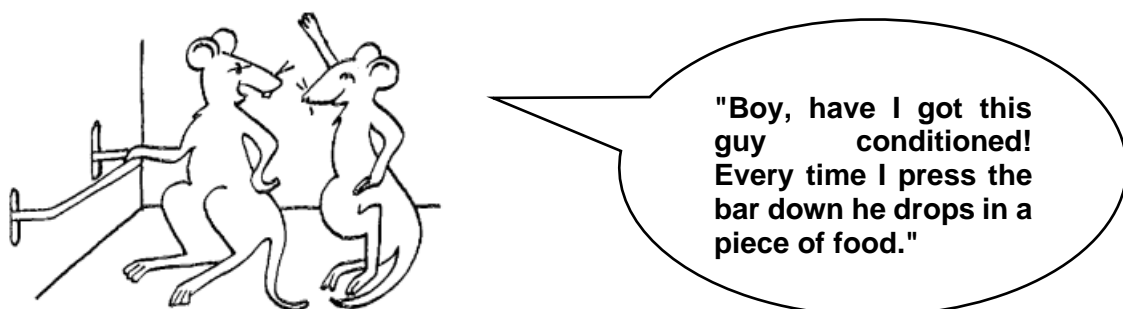


Abbildung 2: A Case History in Scientific Method, B. F. Skinner (1955).

Er führte den Begriff der Verstärkung ein. Ein Verhalten kann demnach durch vier Konsequenzen geformt werden: positive und negative Verstärkung sowie positive und negative Bestrafung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Kontingenzschema. Positive und negative Verstärkung und Bestrafung (Schermer, 2006).

	Verhalten wird häufiger gezeigt	Verhalten wird seltener gezeigt
Hinzufügen eines Reizes	<p style="text-align: center;">Positive Verstärkung (PV)</p>	<p style="text-align: center;">Positive Bestrafung (PB)</p>
Wegnehmen eines Reizes	<p style="text-align: center;">Negative Verstärkung (NV)</p>	<p style="text-align: center;">Negative Bestrafung (NB)</p>

Negative Bestrafung (NS):

Ein Verhalten wird negativ bestraft, wenn auf eine Reaktion eine angenehme Konsequenz ausbleibt. So wird der Maus das Futter entzogen, sobald sie in den Tunnel läuft. Die Maus wird das Verhalten seltener zeigen.

Positive Bestrafung (PB):

Ein Verhalten wird positiv bestraft, wenn auf eine Reaktion eine unangenehme Konsequenz folgt. Läuft die Maus in den Tunnel, wird sie mit Luft angepustet. Aufgrund dessen wird die Maus das Verhalten weniger zeigen und läuft seltener in den Tunnel.

Negative Verstärkung (NV):

Ein Verhalten wird negativ verstärkt, wenn eine unangenehme Konsequenz ausbleibt oder beendet wird. Die Maus wird die ganze Zeit mit Luft angepustet und sobald sie in den Tunnel läuft, hört der Luftstrom auf. Auch hier wird die Maus das Verhalten öfter zeigen.

Positive Verstärkung (PV):

Ein Verhalten hat eine positive, angenehme Konsequenz zur Folge. Die Maus zeigt spontan ein freiwilliges Verhalten, z.B. läuft sie in einen Tunnel. Dieses Verhalten wird mit Futter belohnt. Daraufhin wird die Maus das Verhalten öfter zeigen (Skinner, 1938).

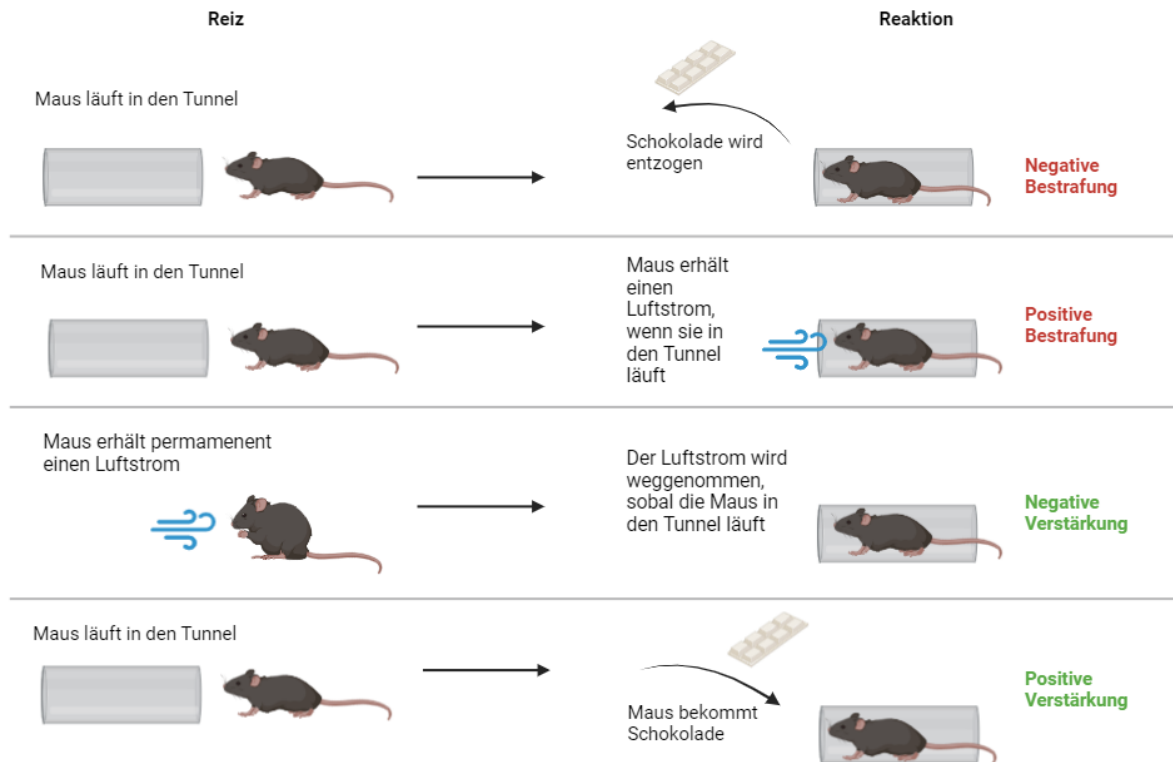


Abbildung 3: Operante Konditionierung: positive und negative Verstärkung sowie Bestrafung. Negative Bestrafung: Die Maus zeigt ein Verhalten (läuft in den Tunnel) und bekommt die Belohnung (Schokolade) entzogen. Die Maus wird das Verhalten seltener zeigen. Positive Bestrafung: Die Maus zeigt ein Verhalten (läuft in den Tunnel) und erhält einen Luftstrom. Die Maus wird das Verhalten seltener zeigen. Negative Verstärkung: Die Maus erhält permanent einen Luftstrom. Sobald sie ein bestimmtes Verhalten zeigt (läuft in den Tunnel) wird der Luftstrom entfernt. So lernt die Maus mit dem Entfernen des negativen Reizes, welches Verhalten den gewünschten Erfolg bringt, und sie wird es öfter zeigen. Positive Verstärkung: Die Maus zeigt ein Verhalten (läuft in den Tunnel) und bekommt daraufhin eine Belohnung (Futter). Sie lernt durch positive Verstärkung. Somit wird sie das Verhalten öfter zeigen (Erstellt mit BioRender.com).

Um welche Verstärkung bzw. Bestrafung es sich handelt, hängt unter anderem von der Reaktion des Tieres ab. Ältere Tiere können sich an einen bestimmten Reiz gewöhnen. Wohingegen jüngere Tiere den Reiz anders empfinden können. So wird ein Verhalten bei älteren Tieren, die den Verstärker (z. B. Futter) als Belohnung bereits kennen, positiv verstärkt. Für junge Tiere, die die Belohnung noch nicht kennen, wirkt sich dies als positive Bestrafung aus. Das Verhalten, welches häufiger gezeigt werden soll, wird seltener.

Nicht nur der Verstärker spielt eine Rolle, sondern auch die Motivation. Ist diese nicht groß genug, wird das Tier das erwünschte Verhalten nicht zeigen. Angenommen Thorndike hätte eine gesättigte Katze in die Box gesetzt. Dann hätte die Katze kaum Motivation gehabt aus der Box zu kommen (Schermer, 2006).

Die positive Verstärkung (PV) ist eine der am häufigsten angewendeten Methoden, um einem Tier eine Assoziierung zwischen einem spontanen Verhalten und der daraus resultierenden Konsequenz aufzuzeigen. Zeigt das Tier ein Verhalten, welches von dem Trainer gewünscht wird, wird es dafür belohnt. Oft wird für die Belohnung Futter verwendet. Die Konsequenz ist für das Tier positiv. Somit wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass das Tier das Verhalten öfter zeigt (PV). Wird das gewünschte Verhalten von dem Tier gezeigt und die Belohnung wird zurückgehalten bzw. entzogen, ist die Konsequenz für das Tier negativ. Somit wird die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass das Tier das Verhalten zeigt (NB). Diese zwei operanten Konditionierungen ergänzen sich immer gegenseitig bei dem positiv verstärkten Training (PVT) (Sørensen et al., 2011). Die Basis des positiv verstärkten Trainings ist die Grundlage des Klickertrainings. Die Ergebnisse der Literatur haben gezeigt, dass ein Training, welches auf der Grundlage der positiven Verstärkung beruht, das Tierwohl verbessert. Eine Verbesserung des Tierwohls zeigt sich z. B. wenn die Tiere durch die positive Verstärkung freiwillig an tierärztlichen Kontrollen mitarbeiten und reduzierte unerwünschte Verhaltensweisen (Stressverhalten, stereotypes Verhalten und Angst) aufweisen (Perlman et al., 2012).

1.3 KLICKERTRAINING – POSITIV VERSTÄRKTES TRAINING

Die Novellierung der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) vom 01.12.2021 legt fest, dass Versuchstiere vor dem eigentlichen Versuch ein Eingewöhnungs- und Trainingsprogramm erhalten müssen (TierSchVersV § 31 Abs. 1 k) (Bundesministerium der Justiz, 2024). Heutzutage wird das Klickertraining bei verschiedenen Tierarten als Training mit positiver Verstärkung verwendet (Fernström et al., 2009, Kogan et al., 2017, Cimorelli et al., 2021). In der Forschung wird das Klickertraining bereits für die tägliche Routine, den Transport und die Injektion unter anderem bei bolivianischen Totenkopffaffen genutzt. Die Affen wurden darauf trainiert, dass weder die Routineaufgaben noch der Transport oder die Fixierung zur Applikation von Injektionen Angst oder Stress bei den Tieren auslösen (Gillis et al., 2012). Dies führt wiederum zu Verbesserung des Wohlbefindens. Bei Mäusen wurden bereits ähnliche Trainingserfolge gezeigt. Deren Wohlbefinden wird durch das Klickertraining soweit verbessert, sodass trainierte Tiere z. B. eine deutliche Reduktion ihres Angstverhaltens zeigen. Des Weiteren ist nachgewiesen worden, dass trainierte Mäuse während der Fixierung weniger urinieren und koten, was ebenfalls auf ein vermindertes Angstverhalten hinweist

(Leidinger et al., 2017, Dickmann et al., 2022). Das Klickertraining sowie die tägliche Interaktion tragen zur Verbesserung des Wohlbefindens der Tiere bei. Eine längere Interaktion der Tiere mit dem Experimentator erleichtert die Handhabung. Durch die täglichen Routineaufgaben gewöhnen sich die Tiere an die Handhabung und reagieren mit einem verminderten Stressverhalten (Marcotte et al., 2021).

1.3.1 SEKUNDÄRER (KLICK) UND PRIMÄRER VERSTÄRKER (BELOHNUNG) DES KLICKERTRAININGS

Das positiv verstärkte Training wird genutzt, um den Tieren ein bestimmtes Verhalten beizubringen. In manchen Situationen ist eine direkte Belohnung des gezeigten Verhaltens nicht möglich. Wird das gewünschte Verhalten nicht direkt belohnt, werden die Tiere falsch konditioniert. Aufgrund der nicht vorhandenen Belohnung ist die Konsequenz für das Tier eine negative Bestrafung. Das Tier wird das gewünschte Verhalten weniger häufig zeigen, obwohl genau dieses Verhalten erwünscht ist. Um das zu vermeiden, wird der Klicker als zeitliche Überbrückung für eine kommende Belohnung eingesetzt. Der Klicker fungiert als sekundärer (konditionierter) Verstärker (Abbildung 13, B). Dabei handelt es sich nicht um eine Belohnung, sondern nur um ein Markierungssignal für ein Verhalten zu einem bestimmten Zeitpunkt. Das Tier wird darauf konditioniert, dass der Klick ein Markierungssignal ist, auf das eine Belohnung (primärer Verstärker) folgt. Ein eigentlich neutraler Stimulus (Klick) führt dann zu einer konditionierten Reaktion. Somit kann ein sekundärer Verstärker nur in Verbindung mit einem primären Verstärker eingesetzt werden. Ein primärer Verstärker bezieht sich auf elementare Bedürfnisse, wie Hunger oder Durst und ist somit kein Lernprozess, sondern angeboren. Die größte mögliche Verstärkung tritt dann auf, wenn eines der Bedürfnisse ein Defizit (Deprivation) aufweist. Als Beispiel hierfür wieder Thorndikes Katze, welche hungrig in die Box gesetzt wurde. Tiere, welche Hunger haben, zeigen eine größere Motivation an Futter zu kommen, wie Tiere die satt sind (Schermer, 2006). Die Belohnung hängt vom Tier ab und kann daher sehr unterschiedlich ausfallen. In den meisten Studien wird Futter wie z. B. Würstchen (Cimarelli et al., 2021), Cheerios, Bananen, Trauben, Erdnüsse (Gillis et al., 2012) oder weiße Schokoladencreme (Abbildung 13, A) (Dickmann et al., 2022) als Belohnung verwendet. Aber auch Berührungen oder Interaktionen können als Belohnung fungieren. Einzel gehalten Ratten lachen, wenn sie gekitzelt werden (Panksepp and Burgdorf, 2000). Dies kann ebenfalls als positiver Verstärker genutzt werden. Eine weitere Belohnungsmöglichkeit wäre der Zugang zu einer „Spielwiese“ ein Käfig oder Gehege mit Anreicherungen zum Spielen. Hier können die Tiere ihre soziale Interaktion, ihren Spieltrieb oder Bewegungsdrang für eine begrenzte Zeit ausüben (Lidfors LM, 2021).

1.4 POSITIVER EFFEKT DES KLICKERTRAININGS

Das Klickertraining als positives Verstärkungstraining hat diverse Einflüsse auf die Tiere. Im folgenden Abschnitt soll darauf näher eingegangen werden. Bei Heimtierkatzen kann das Klickertraining die Interaktion mit dem Menschen verbessern und den Stress minimieren. Katzen können durch das Klickertraining in begrenzter Zeit neue Verhaltensweisen erlernen. Das Alter und das Geschlecht hatten dabei keinen Einfluss auf den Lernprozess der Katzen. Eine Anreicherung des tristen Katzenalltags und eine stimulierende Aktivität verbesserten die körperliche Gesundheit (Kogan et al., 2017). Eine Katze, die sich wohlfühlt, ist zu seinem Besitzer freundlicher, was die Wahrscheinlichkeit für eine Adoption erhöht (Weiss et al., 2012). Außerdem wird die Interaktion mit dem Menschen verbessert, was z. B. das Angstverhalten bei Ernährungsversuchen minimiert (Gourkow et al., 2014). Das Gleiche wurde auch bei Kaninchen festgestellt. Diese Tiere interagieren freiwillig mit Ihrem Trainer und springen sogar auf ihren Schoß. Bei unbekanntem Personen haben die Kaninchen dieses Verhalten nicht gezeigt, jedoch gewöhnen sich die Kaninchen sehr schnell an die neue Person. Keines der Kaninchen war zu schüchtern, um mit der unbekanntem Person zu interagieren. Im Gegenteil, diese waren sehr explorativ und interessiert, was auf ein vermindertes Angstverhalten schließen lässt und somit auf ein verbessertes Wohlbefinden. (Hohlbaum et al., 2024).

Das Klickertraining zur Blutabnahme bei Grizzlybären führte zu einer deutlichen geringeren Stresshormonkonzentration (Corticosteron) im Blut. Normalerweise werden die Bären narkotisiert, um ihnen Blut abzunehmen. Selbst nach mehrmaligen Blutabnahmen zeigten diese Tiere nach Visualisierung des Narkosepfieles ein aufgeregtes Verhalten mit Erbrechen. Trainierte Tiere zeigten dieses Verhalten nicht. Sie wurden darauf trainiert, in einen Käfig zu laufen, sich auf die rechte Seite zu positionieren und das linke Hinterbein durch die Gitter auf einer Box abzulegen (Joyce-Zuniga et al., 2016). Hier trägt das Klickertraining definitiv zu einer Verbesserung des Wohlbefindens bei. Die Bestimmung des Stresshormons ist ein guter Indikator, um eine Aussage über das Wohlbefinden zu treffen.

Bei den kleinen Labortieren ist es jedoch schwierig, das Wohlbefinden zu bewerten. Oft reicht die Messung des Stresshormons nicht aus. Daher ist es wichtig, deren Verhalten genauer zu beobachten. Durch Verhaltensbeobachtungen können z.B. Rückschlüsse auf chronische Schmerzen gezogen werden. Tiere, die Schmerzen empfinden, zeigen unter anderem eine verminderte Aktivität, eine abnormale (gekrümmte) Haltung, veränderte Atmung, hörbare Schmerzlaute, verminderte Fellpflege und eine Reduktion des Körpergewichtes durch eine veränderte Fressaktivität (Animals., 1992). Daher ist die Überwachung und Messung des Körpergewichtes der Tiere ein guter Indikator zur Bestimmung des Wohlbefindens.

Zusammenfassend spiegelt der positive Effekt sich in der Reduktion des Angstverhaltens, der erhöhten Interaktion mit dem Menschen und der freiwilligen Mitarbeit der Tiere bei

Routearbeiten wie dem Wiegen wider. Durch diese freiwillige Mitarbeit kann das Stresshormonlevel im Blut reduziert werden. Hinzu kommt, dass die Tiere ein längeres, exploratives Verhalten zeigen, d. h. sie sind neugieriger und zeigen ein größeres Interesse am Menschen beim ersten Kontakt. Aufgrund dieser positiven Effekte trägt das Klickertraining zur Verbesserung des Wohlbefindens bei.

Dieser positive Effekt kann auch bei Mäusen festgestellt werden. Die Untersuchung des Angstverhaltens mittels offener Feld Test und erhöhtem Pluslabyrinth-Test zeigt bei trainierten Tieren eine Reduktion des Angstverhaltens. Besonders die weiblichen Tiere profitieren davon. Die männlichen Tiere zeigen hingegen eine Reduktion der Anzahl an Läufen im CatWalk. Beide Geschlechter sind durch das Klickertraining motivierter, die Leistung im CatWalk zu verbessern. Auf die herkömmlichen Methoden, das Anpusten (aversiver Reiz) der Tiere, damit diese sich fortbewegen, kann verzichtet werden (Dickmann et al., 2022).

Das Klickertraining ist eine nützliche Refinementmethode für den Laboralltag. Allerdings weist es noch einige Schwachstellen auf. Viele Trainingsprotokolle erstrecken sich über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen (Leidinger et al., 2017, Leidinger et al., 2018, Hohlbaum et al., 2024). Mit zunehmender Dauer des Trainingsprotokolls steigt auch die Anzahl der potenziellen Variablen und Fehler. Juvenile Mäuse werden frühestens im Alter von P 21 von ihren Müttern entwöhnt. Werden Experimente mit Mäusen im Alter von 6 Wochen begonnen, ist ein vierwöchiges Trainingsprotokoll zeitlich nicht umsetzbar. Des Weiteren kommt es auf die Komplexität eines Versuchsaufbaus in der klinischen Forschung an. Dieser Aufbau kann zeitlich stark variieren, wodurch die Tiere teilweise weniger als vier Wochen in der Haltung bleiben, z. B. im Bereich der Diagnostik oder der Medikamentenforschung.

1.5 DIE LABORMAUS - MUS MUSCULUS

Abbie E. C. Lathrop (1868-1918) erschien mit ihrer Arbeit 1913 in der Zeitung „THE SPRINGFIELD WEEKLY REPUBLICAN“. Sie hatte sich wilde Mäuse besorgt und diese untereinander verpaart. Ein paar der Tiere verkaufte sie im Anschluss an Forschungseinrichtungen. Einige der Tiere behielt sie und forschte selber an ihnen. Sie bemerkte, dass die Tiere Hautläsionen bekamen. Diese Läsionen stellten sich als bösartig heraus, wodurch die Tiere daran verstarben. Abbie Lathrop fand heraus, dass diese Läsionen vererbbar sind. Durch diese Erkenntnis legte sie den Grundstein für die heutige Krebsforschung (1913, Shimkin, 1975). William Ernst Castle, ein Genetiker, kaufte 1902 einige von Lathrops Mäusen für sein Labor. Er leitet das Institut Biological Research an der Harvard Universität. Einer seiner Schüler, Clarence Cook Little, forschte ebenfalls mit Mäusen und gründete 1921 seine eigene Einrichtung. Das waren die Anfänge des C57BL/6 Stammes. Seine Einrichtung züchtet heute noch immer Inzuchtstämme. Sie wird seit 1948 unter dem

Namen Jackson Laboratory geführt (Steensma et al., 2010). Der C57BL/6 Mausstamm ist einer der am häufigsten in der biomedizinischen Forschung verwendeten Inzuchtstämme (Abbildung 4, A). Aufgrund der Verpaarung von Bruder und Schwester für mehr als 20 Generationen sind Inzuchtstämme nahezu identisch im Genotyp. Das hat zur Folge, dass die Reproduzierbarkeit der Forschungsergebnisse bei Verwendung dieser Inzuchttiere sehr hoch ist. Ein weiterer Vorteil des Stammes ist die hohe Lebenserwartung von zwei Jahren - aufgrund dessen wird der Stamm gerne für die Altersforschung genutzt. Aber auch in Forschungsbereichen wie der Onkologie, Immunologie, Infektionskrankheiten und kardiovaskulären Krankheiten wird dieser Stamm häufig verwendet. Ein weiterer Grund, wieso der C57BL/6 Stamm so beliebt ist, ist die Verwendung als genetischer Hintergrund bei transgenen Mäusen. Transgene Mäuse werden als Modell genutzt, um Krankheiten beim Menschen zu erforschen (Labs, 28.06.2024).

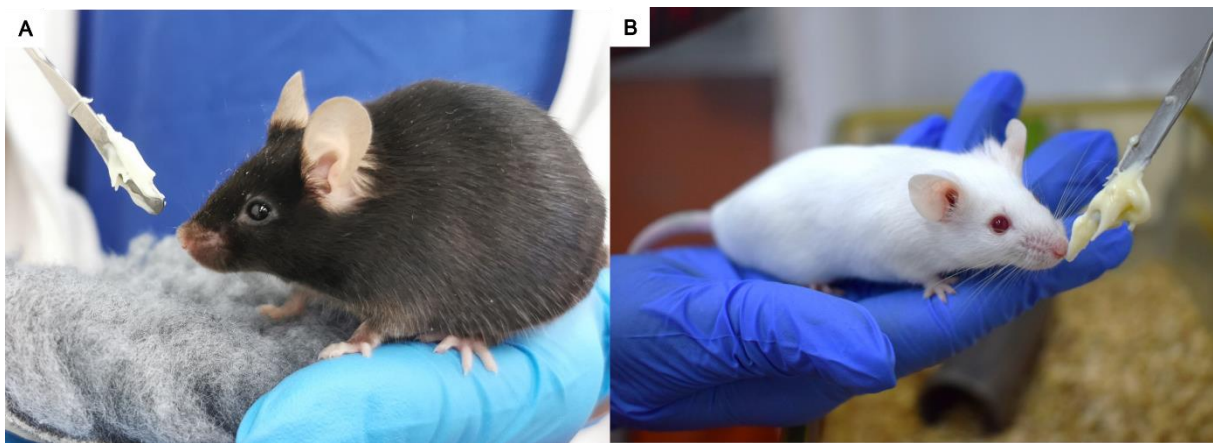


Abbildung 4: Zwei Mausstämme aus der klinischen Forschung. (A) Inzuchtstamm: C57BL/6JRj und **(B)** Auszuchtstamm: CrI:CD1(ICR). Bildquelle: Sandra Reichel, (A) 2023/(B) 2021.

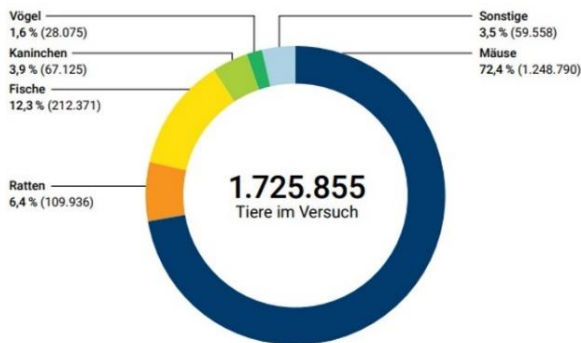
Nicht nur Inzuchtstämme haben die Geschichte unserer heutigen Labormaus geprägt, sondern auch Auszuchtstämme, wie der CrI:CD1(ICR) Stamm (Abbildung 4, B). Die Herkunft dieses Albino Auszuchtstammes geht auf das Jahr 1926 zurück. Dr. Clara Lynch (1882-1985) vom Rockefeller Institut für medizinische Forschung in New York importierte damals zwei männliche und sieben weibliche Mäuse aus dem Schweizer Bestand von André de Coulon (Frankreich). Daraus entstand auch der Name „Swiss“ für den Mausstamm (Lynch, 1969, Chia et al., 2005). Clara Lynch übergab 1932 die Mäuse an zwei Forscher – einer von ihnen war vom Institute for Cancer Research (ICR) in Philadelphia. Sie züchteten den Stamm als Ha/ICR, welcher 1948 von Dr. Edward Mirand des Roswell Park Memorial Institut, Buffalo, New York, als Ausgang für seine Zucht des HaM/ICR Stammes diente. Diese Zuchten waren die ersten Anfänge des heutigen Charles River Laboratories, welches 1947 von Dr. Henry Foster gegründet wurde (River, 2024a, River, 2024b). 1959 wurde aus dem HaM/ICR Stamm

erstmalig der CD1 Stamm von Charles River gezüchtet. Die zweite Forscherin, der von den Tieren von Lynch profitierte, war Leslie Webster. Für ihre Forschung wurden die Tiere an einen Züchter, Carworth Farms, in England weitergegeben. Zusammen produzierten sie den „SwissWebster“ Auszuchtstamm. „SwissWebster“ und CD1 Mäuse haben demnach den gleichen Ursprung, wurden aber 1926 getrennt (Lynch, 1969, Chia et al., 2005). In der aktuellen Forschung wird der CD1-Stamm häufig in den Bereichen Toxikologie, Altersforschung und Onkologie verwendet (Wolf et al., 2007; Michalikova et al., 2008; Waalkes et al., 2006). Außerdem eignet sich dieser Stamm wegen seiner Größe gut für operative Eingriffe. Aufgrund der breitgefächerten Einsatzmöglichkeiten für C57BL/6 und CD1 sollen die Auswirkungen des Klickertrainings anhand dieser beiden Stämme untersucht werden.

Die aktuellen Daten zu den Versuchstierzahlen 2022 des Bundesinstitutes für Risikobewertung bestätigen die Tatsache, dass die Maus das am häufigsten genutzte Versuchstier in Deutschland ist. Die Daten (Risikobewertung, 2024a) zeigen, dass im Jahr 2022 2.437.794 Tiere für Versuche genutzt wurden. Davon sind 1.248.790 (72,4%) Mäuse nach § 7 Abs. 2 TierSchG und 616.724 (86,6 %) Mäuse nach § 4 Abs. 3 TierSchG genutzt worden (Abbildung 5). Unter den 1.248.790 Mäusen, die für § 7 genutzt worden sind, sind 472.433 (37,83%) genetisch nicht veränderte und 776.357 (62,17 %) genetisch veränderte Tiere (Risikobewertung, 2024b). Die meisten Tierversuche dienen der Grundlagenforschung. Sie macht den Hauptteil (55,4 %) der für wissenschaftliche Versuchszwecke verwendeten Tiere aus.

Verwendete Tierarten 2022

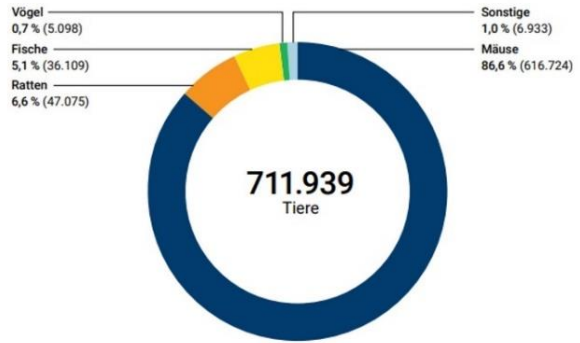
für Tierversuche gem. § 7 Abs. 2 TierSchG



Anteil der Tierarten in Prozent (absolute Zahl in Klammern)
Quelle: Bundesinstitut für Risikobewertung (2023), CC-BY 4.0

Zu wissenschaftlichen Zwecken getötete Tiere 2022

gem. § 4 Abs. 3 TierSchG nach Tierarten



Anteil der Tierarten in Prozent (absolute Zahl in Klammern)
Quelle: Bundesinstitut für Risikobewertung (2023), CC-BY 4.0

(Quelle: Bundesinstitut für Risikobewertung (2023) CC-BY 4.0)

Abbildung 5: Gesamtanzahl der verwendeten Tiere für Tierversuche gemäß § 7 Abs. 2 TierSchG und zu wissenschaftlichem Zweck gemäß § 4 Abs. 3 TierSchG getöteten Tiere für das Meldejahr 2022. Es wurden insgesamt 2.437.794 Tiere verwendet. Diese Zahl ist rückläufig und es wurden 2,6 % weniger Tiere als im Jahr 2021 für Tierversuche genutzt (Risikobewertung, 2024a).

1.6 EINFLUSS VON STRESS AUF DIE LABORMAUS

Das Wohlbefinden der Mäuse kann durch das Klickertraining verbessert werden (Dickmann et al., 2022). Dies ist von großem Interesse, da zahlreiche Faktoren das Wohlbefinden der Tiere verschlechtern können. Einer davon ist Stress. Dieser Abschnitt befasst sich mit den Faktoren und den Folgen von Stress bei der Labormaus.

Ein entscheidender Faktor sind die Laborbedingungen. Die Laborbedingungen unter denen die Tiere gehalten werden, bedeuten oftmals Stress z. B. das Herausnehmen der Tiere, Fixierung, Geräusche, Gerüche, Licht usw., was sich wiederum auf ihr Verhalten und deren Gesundheit auswirkt. Durch Käfiganreicherungen und verfeinerte Handhabungen kann das Wohlbefinden der Tiere bereits verbessert werden. Dennoch gibt es einige Faktoren, die bisher noch nicht vermieden werden können.

Licht ist ein Umweltfaktor der einen großen Einfluss auf das Verhalten der Tiere hat. Nicht nur das es den zirkadianen Rhythmus regelt sondern auch weil es viele hormonelle und metabolische Abläufe im Tier beeinflussen kann (Dauchy et al., 2024). Daher ist die

Lichtintensität in Haltungsräumen geregelt und sollte 200 Lux nicht überschreiten (Azar et al., 2008). Zu hohe Lichtintensitäten können Retinadegenerationen bei nachaktiven Nagern verursachen. Besonders davon betroffen sind die Albino-Tiere (LaVail et al., 1987). Aufgrund dessen sollten diese Tiere nicht in den obersten Reihen vom Gestell untergebracht werden. Die Käfigposition im Gestell bestimmt, wie viel Licht bei dem Tier im Käfig noch ankommt. Die Lichtintensität ist in den obersten Reihen des Gestelles mehr als doppelt so hoch, wie in den unteren Käfigen. Die Auswertungen der Stressparameter ergaben, dass die Tiere durch die höhere Lichtintensität in den oberen Positionen des Gestelles eine erhöhte Corticosteronkonzentration im Kot hatten als in den unteren Reihen. Das Gleiche betrifft auch die Vibrationen, sofern die Lüftungsanlage auf dem Tiergestell befestigt ist. Der Geräuschpegel unterscheidet sich kaum in der Position des Käfigs im Gestell(Clancy et al., 2023).

Die Hauptaktivitätszeit von Mäusen ist während der Dämmerungsphase und in der Nacht. Dennoch müssen die tierpflegerischen Arbeiten während des Tages stattfinden. Während dieser Zeit kommt es vermehrt zu erheblichen Lärmgeräuschen und Vibrationen. Die Käfige werden aus den Gestellen genommen und auf den Tisch gestellt. Auch bei dem Befüllen der Futterraufe mit Pellets oder dem fließenden Leitungswasser wurden Lärmgeräusche für die Tiere aufgenommen (Voipio et al., 2006). Mäuse haben ein Hörvermögen im Bereich von 1 kHz bis 100 kHz. Besonders empfindlich sind sie im Bereich zwischen 10 kHz und 20 kHz(Ehret, 1989). Dieser Frequenzbereich erlaubt es den Mäusen, Töne im Ultraschallbereich zu hören, die sie häufig zur Kommunikation nutzen, etwas bei sozialen Kontakten oder bei der Paarung.(Holy and Guo, 2005). Aufgrund dessen sind die Mäuse sehr sensitiv bezüglich Geräusche. Es sollte darauf geachtet werden unnötigen Lärm zu vermeiden (Jafari et al., 2017). Auch andere Personen, die die Tierräume betreten, lösen Lärmgeräusche und Vibrationen aus. Vibrationen können das Wohlbefinden der Tiere ebenfalls beeinflussen. Allerdings hängt das auch von der Intensität ab. Geringe Vibrationen (Clancy et al., 2023) haben keinen negativen Einfluss auf das Wohlbefinden, während intensivere Vibrationen das Stresshormon bei weiblichen Mäusen erhöhen können (Atanasov et al., 2015). Der routinemäßige Alltag (vorgeschrieben Gesundheitskontrollen der Tiere, das Betreten von Räumen etc.) in den Tierräumen hat Auswirkungen auf die Tiere. Jedoch können sich die Tiere an bestimmte Situationen gewöhnen, sodass die Konzentration des Stresshormons nachweislich reduziert wird (Clancy et al., 2023). Zu dem routinemäßigen Alltag gehört auch die wöchentliche Käfigreinigung, die ein weiterer Stressfaktor sein kann. Dieser Prozess führt zu einer Störung des Schlafes der nachaktiven Tiere für die nächsten 3 Stunden (Febinger et al., 2014). Außerdem wurde nachgewiesen, dass männliche Tiere des C57BL/6J Stammes erhöhte Serumcorticosteronwerte nach dem Käfigwechsel haben. Der Käfigwechsel hat eine Verschlechterung des angstähnlichen Verhaltens zur Folge. Daher sollte der Käfigwechsel in

den Experimenten berücksichtigt werden. Verhaltenstests nach einem Käfigwechsel können die Ergebnisse beeinflussen und zu Verfälschungen führen (Rasmussen et al., 2011). Nicht nur das Verhalten wird durch Stress beeinflusst, sondern auch physiologische Parameter wie die Temperatur, Herzfrequenz und Aktivität. Die Körpertemperatur und die Herzfrequenz steigen kurz nach einer Stressexposition an (Taitt and Kendall, 2019).

Der größte stressauslösende Faktor ist vermutlich der Wissenschaftler selbst. Die Anwesenheit des Menschen, insbesondere wenn sie ungewohnt oder unerwartet ist, kann bei Mäusen Stress und Verhaltensänderungen auslösen. Hier kommt es besonders auf die Handhabungen der Tiere an. Die Handhabung am Schwanz der Mäuse löst bei den Tieren Stress und angsthohes Verhalten aus, woraufhin die Interaktion mit dem Wissenschaftler vermieden wird (Gouveia and Hurst, 2019). Eine verfeinerte Handhabung durch den Wissenschaftler verbessert also das Wohlbefinden der Tiere, indem sie den Stress und die Angst minimiert. Eine Gewöhnung an den Wissenschaftler ist ratsam. Dadurch können ein geringeres Angstverhalten vor großen Höhen (EPM) und eine bessere räumliche Wahrnehmung (Y-Maze) bei den Tieren nachgewiesen werden (Ueno et al., 2020).

Es gibt zahlreiche weitere Faktoren, die Stress bei den Labortieren hervorrufen können, jedoch sind die Folgen stets identisch. Welcher Faktor im Endeffekt den Stress ausgelöst hat, ist irrelevant. Langanhaltender Stress führt bei Mäusen zu Veränderung des Sozialverhaltens, des Angst-assoziierten und Depressions-assoziierten Verhaltens sowie kognitiver Beeinträchtigung und Lernstörungen (Becker et al., 2021, Gellner et al., 2022). Nach einer siebentägigen Stressexposition vermieden Mäuse des BALB/c Stammes die soziale Interaktion mit Artgenossen und entwickelten ein angsthohes Verhalten. Des Weiteren könnten Veränderungen in der Gehirnfunktion sowie eine Gewichtsreduzierung festgestellt werden (Okamura et al., 2022). Eine zehntägigen Stressexposition bei C57BL/6J Mäusen hat eine deutliche Verschlechterung des Nestbauverhaltens sowie eine Gewichtsreduktion zur Folge. Des Weiteren konnte ein Anstieg der Corticosteronkonzentration im Kot (Serradas et al., 2022) und Plasma (Gellner et al., 2022) nachgewiesen werden. Eine Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten konnte durch den Rotarod Test gezeigt werden (Serradas et al., 2022). Dies sind alles Anzeichen für eine Verschlechterung des Wohlbefindens der Tiere durch Stress.

Das Klickertraining soll dazu beitragen das Wohlbefinden zu verbessern indem die Stressexposition minimiert und die Folgen reduziert werden. Durch das Klickertraining können die Tiere sich an den Umgang mit dem Wissenschaftler gewöhnen. Ein täglicher Kontakt soll die Interaktion mit dem Wissenschaftler erhöhen und das angsthohes Verhalten sowie Stressverhalten minimieren. Aufgrund dessen würde es zeitgleich zu einer Verbesserung des Tierwohls kommen.

1.6.1 EINFLUSS VON PRÄPARTALEM STRESS AUF DIE POSTNATALE VERSORGUNG

Die Folgen von Stress auf die biologischen Prozesse sind weitreichend. In diesem Abschnitt wird daher nur auf die Auswirkung von Stress auf die postnatale Versorgung, die Pflege und Aufzucht von Neugeborenen durch die Mutter, bei Mäusen eingegangen. Die postnatale Versorgung ist ein kritischer Faktor für das Überleben. Stress bei der Mutter, kann die Versorgung erheblich beeinträchtigen und kann im schlimmsten Fall zum Tod der Jungtiere führen. Des Weiteren führt mütterlicher Stress während der Schwangerschaft zu Beeinträchtigungen in der neurologischen Entwicklung der Nachkommen, was im Erwachsenenalter zu Depression und Verhaltensänderungen führen kann (Becker et al., 2021). Der pränatale Stress führt außerdem zu dauerhaften Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA), was wiederum ein erhöhtes Angstverhalten zur Folge hat (Paris et al., 2011, Brunton, 2013). Pränataler Stress wird von verschiedenen Umweltfaktoren beeinflusst. So führt zu wenig Käfigmaterial, wie ein Unterschlupf und Nestmaterial während der Schwangerschaft zu einer Stressreaktion bei den Müttern. Dadurch kommt es zu einer hohen Sterblichkeit, zu einem geringeren Gewicht und zu einer verzögerten Entwicklung der Neugeborenen. Eine Anreicherung an Käfigmaterial kann die Sterblichkeit nicht verringern, sie kann jedoch die Entwicklung der Neugeborenen verbessern (Leidinger et al., 2019). Die Gesundheit und Entwicklung der Neugeborenen hängen stark von den Stressreaktionen der Mütter während der Schwangerschaft ab. Präpartaler Stress kann Auswirkungen auf die postnatale Versorgung haben, was sich in der späteren Lebensphase der Nachkommen in neuropsychiatrischen Störungen niederschlagen kann (Schwendener et al., 2009, Nishigawa et al., 2018). Es gibt einen Unterschied, wann die Stressexposition stattfindet. Tritt der Stress zu Beginn der Schwangerschaft auf, führt es dazu, dass die Embryonen resorbiert werden (Gendron et al., 1990, Brunton and Russell, 2010). Sind die Embryonen bereits weit entwickelt, können sie nicht mehr resorbiert werden. Es kommt zu einer Frühgeburt, bei der die Nachkommen ein geringes Geburtsgewicht und eine geringe Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen. Oftmals ist die Wurfgröße reduziert (de Catanzaro, 1988, Brunton and Russell, 2010) und sie neigen zur späteren Anfälligkeit für Krankheiten (Brunton, 2013). Nach einer pränatalen Stressexposition zeigen Ratten ein abnormales Sozialverhalten (Lee et al., 2007). Der pränatale Stress hat einen so großen Einfluss auf das zukünftige Verhalten der Mütter. Das wiederum hat Auswirkungen auf die folgenden Generationen (Meaney et al., 2007). Alle diese Auswirkungen haben eine Verschlechterung des Wohlbefindens zur Folge.

Während negative Reize, wie präpartaler Stress negative gesundheitliche und verhaltensbezogene Auswirkungen haben, können positive Reize, wie das Klickertraining in

Form eines positiven Verstärkungstrainings, das emotionale und psychische Wohlbefinden von Tieren fördern.

1.6.2 HORMONKASKADE AUSGELÖST DURCH EINE STRESSEXPOSITION

Als Antwort auf einen Stressor reagiert die Maus mit der Ausschüttung von Stresshormonen (Abbildung 6). Bei der Koordination von Stresshormonen spielt die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) eine entscheidende Rolle. Der Hypothalamus verarbeitet Informationen, welche vom Körper und dem Gehirn aufgenommen werden und löst einen Signalweg aus. Der Stressreiz aktiviert die hypophysiotropen Neurone, die sich im Hypothalamus befinden und Corticotropin-Releasing-Hormone (CRF) synthetisieren. Das Corticotropin-Releasing-Hormon wird in die hypophysiellen Pfortadergefäße freigesetzt. Von dort aus gelangen die Hormone in die Nähe des Hypophysenvorderlappens. Am Hypophysenvorderlappen kann das CRF an Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor Typ 1 (CRFR1) binden. Die Folge davon ist die Aktivierung des Adenosinmonophosphat (cAMP) Signalweges. Diese Aktivierung führt zur Synthese des adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Das freigesetzte ACTH gelangt in die Nebennierenrinde, wo es an den Melanocortin-Typ2-Rezeptor (MC2-R) bindet. Die Bindung von ACTH an den MC2-Rezeptor führt zu einem Anstieg des cAMP Spiegels. Das hat einen Anstieg von Cholesterin zur Folge, welches für die Synthese von Glucocorticoiden notwendig ist (Herman et al., 2016). Das Hauptglucocorticoid, welches bei einer Stressreaktion bei Nagetieren synthetisiert wird, ist das Corticosteron (Abbildung 7). Die Freisetzung in den Kreislauf bereitet den Körper auf die Bewältigung des Stressreizes vor.

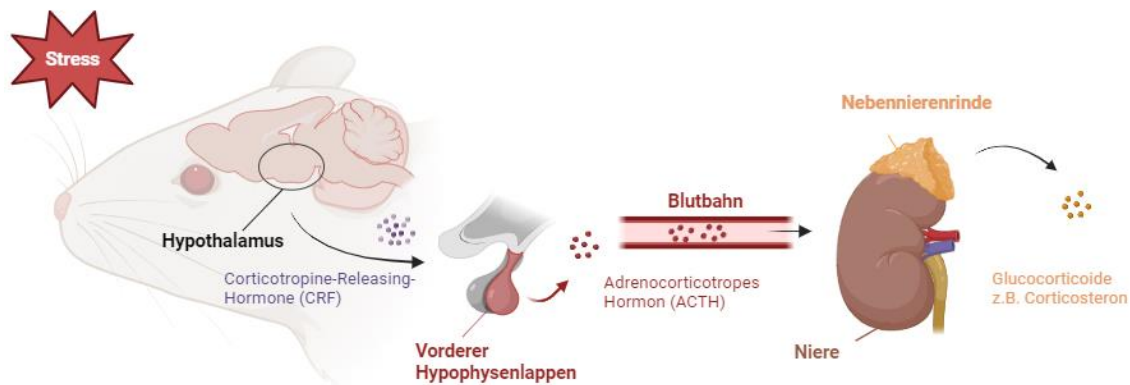


Abbildung 6: Übersicht der Corticosterausschüttung nach einem Stressreiz. Der Hypothalamus verarbeitet den Reiz, welcher zuvor vom Gehirn aufgenommen wurde, indem er Corticotropin-Releasing-Hormone (CRF) freisetzt. Diese CRF gelangen in den angrenzenden Hypophysenvorderlappen. Durch die Bindung an den Rezeptor (CRFR1) wird das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) freigesetzt. Das ACTH gelangt über die Blutbahn in die Nebennierenrinde, wo es an den Melanocortin-Typ2-Rezeptor (MC2-R) bindet. Durch die Bindung an den Rezeptor wird die Synthese von Glucocorticoiden wie dem Corticosteron aktiviert (Smith and Vale, 2006)(Erstellt mit BioRender.com).

Das Corticosteron gelangt in die Leber, wo es die Glukogenese fördert. Hier wird Glykogen zu Glucose abgebaut. Dadurch erhöht sich die Plasmaglukose, wodurch das Gehirn mit mehr Energie versorgt wird. So wird die maximale Gehirnfunktion erreicht (Kuo et al., 2015). Das synthetisierte Corticosteron kann über die Glucocorticoidrezeptoren eine negative Rückkopplung im Hypothalamus auslösen, wodurch die Ausschüttung von Corticosteron reduziert und die Stressantwort beendet wird (Herman and Cullinan, 1997). Daraufhin kann sich die Maus erholen und die Homöostase wird wiederhergestellt (Kuo et al., 2015). Kurzzeitig andauernde Stressreize sind unproblematisch. Bei einer anhaltenden Ausschüttung von Corticosteron, wie sie bei chronischem Stress auftritt, kann es jedoch zu einer beeinträchtigten Glukosetoleranz kommen (Di Dalmazi et al., 2012). Es wurde festgestellt, dass Mäuse, die chronischem Stress ausgesetzt sind, Verhaltensweisen zeigen, die mit Depression und Angst in Verbindung stehen (Lin et al., 2016, Okamura et al., 2022). Es können auch Verdauungsstörungen (Schneider et al., 2023) oder sogar Krebserkrankungen auftreten (He et al., 2024). Die Auswirkungen von chronischem Stress können nicht nur zu verschiedenen Krankheiten oder Verhaltensänderungen führen, sondern auch zu einem Schwangerschaftsabbruch. Bei chronischem Stress wird vermehrt Corticosteron ausgeschüttet, was die Synthese von Progesteron bei Mäusen hemmt (Wiebold et al., 1986) (Abbildung 7). Progesteron ist ein notwendiges Hormon, welches die Schwangerschaft aufrechterhält. Es sorgt dafür, dass das Uterusgewebe stabilisiert wird und das Immunsystem der Mutter den Embryo nicht abstößt. Das Corticosteron unterdrückt die HPA-Achse, so dass weniger Progesteron gebildet wird. Das führt zu einem erhöhten Risiko eines

Schwangerschaftsbruches (Arck, 2001, Solano and Arck, 2019). Welche Auswirkungen ein erhöhter Corticosteronspiegel bei Nagetieren hat, ist jedoch noch nicht vollständig bekannt (Gong et al., 2015).

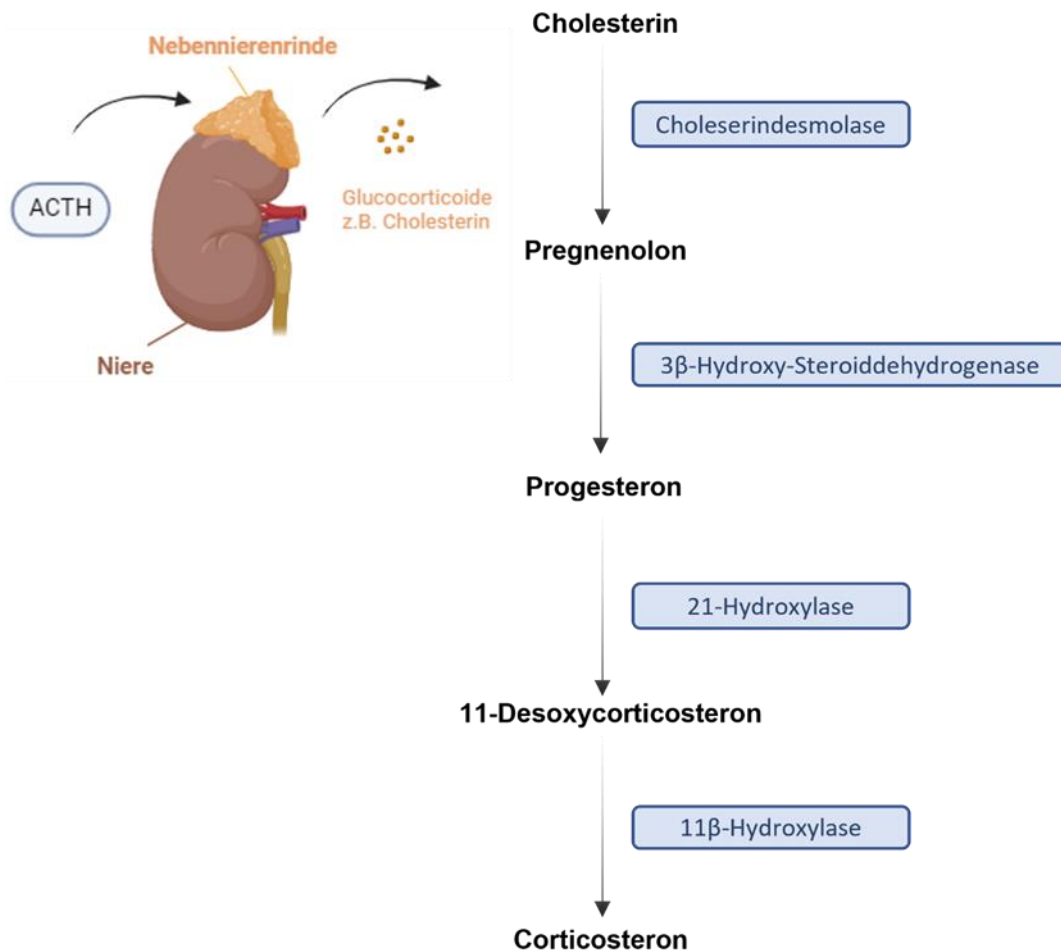


Abbildung 7: Syntheseweg von Corticosteron in der Nebennierenrinde. Das Hypophysenhormon ACTH, welche aufgrund von einem Stressor ausgeschüttet wird, aktiviert die Synthese von Cholesterin. Cholesterin wird von der Cholesterindesmolase zu Pregnenolon umgewandelt. Pregnenolon wird durch die 3β-Hydroxy-Steroiddehydrogenase zu Progesteron umgesetzt. Progesteron wird dann durch die 21-Hydroxylase zu 11-Desoxycorticosteron und dann mittels 11β-Hydroxylase zum Corticosteron (Erstellt mit BioRender.com) (Offermanns, 2020).

1.7 GLUCOCORTICOID – CORTICOSTERON

Das wichtigste Glucocorticoid bei Nagetieren zur Identifizierung einer Stressreaktion ist das Corticosteron (Ataallahi et al., 2022). Dies kann in verschiedenen Proben nachgewiesen werden. Diese unterscheiden sich zwischen flüssigen Proben wie Blut, Speichel (Nohara et al., 2016), Urin (Touma et al., 2003) und Milch (Leenaars et al., 2020), halbfesten Proben wie Kot (Touma et al., 2004a) sowie festen Proben wie Haaren (Yu et al., 2015). Alle drei verschiedenen Probenarten haben Vor- und Nachteile. In flüssigen Proben kann der akute

Stress durch Analyse der Corticosteronkonzentration untersucht werden. Die halbfesten und festen Proben wie Kot oder Haare eignen sich für die Untersuchung des chronischen Stresses (Gong et al., 2015). Aber nicht nur die Art der Probe kann die Corticosteronkonzentration beeinflussen, sondern auch viele andere Faktoren wie das Geschlecht, das Alter, der genetische Hintergrund und der zirkadianer Rhythmus (van der Mierden et al., 2021). Der zirkadiane Rhythmus der Corticosteronkonzentration im Ruhezustand wiederholt sich nahezu alle 24 Stunden. Der Beginn des Rhythmus ist in den Morgenstunden, dann ist die Konzentration ($< 5 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$) am geringsten. Die höchste Konzentration wurde in den Abendstunden ($15\text{-}20 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$) nachgewiesen (Spencer and Deak, 2017). Der zirkadiane Rhythmus stimmt mit dem Hell-Dunkel-Zyklus in der Tierhaltung meistens überein. Geht das Licht aus, werden die nachtaktiven Tiere wach und die Corticosteronkonzentration steigt auf den Höhepunkt. Die Werte können sich jedoch verschieben, wenn die Tiere auf Futter oder Wasserentzug gesetzt werden. Wird das Futter nur in den Morgenstunden angeboten, verschiebt sich die Phase der Corticosteronausschüttung und der Höhepunkt ist während der Futteraufnahme. Die Konzentration ist im Laufe des 24 Stunden Rhythmus jedoch relativ konstant (Kalsbeek et al., 2012). Nicht nur der zirkadiane Rhythmus bestimmt den Spiegel der Stresshormone, sondern auch das Geschlecht beeinflusst die Konzentration von Corticosteron im Ruhezustand. Es wurde nachgewiesen, dass weibliche Tiere ($129 \pm 11 \text{ ng/mL}$) eine höhere Konzentration haben, als männliche Tiere ($102 \pm 21 \text{ ng/mL}$) (Atkinson and Waddell, 1997, Touma et al., 2004). Die Konzentration ist bei den weiblichen Tieren zusätzlich noch vom Fortpflanzungszyklus abhängig. Während der Östrus-Phase ist die Konzentration am geringsten ($129 \pm 11 \text{ ng/mL}$) und nimmt mit der Metöstrus über die Diöstrus bis hin zur Proöstrus-Phase ($246 \pm 14 \text{ ng/mL}$) zu. Weibliche Tiere zeigen außerdem eine größere Aktivierung der HPA-Achse während einer Stressindikation (Atkinson and Waddell, 1997). Nicht nur das Geschlecht, sondern auch die Hierarchie hat einen Einfluss auf die Corticosteronkonzentration. Weiblich dominante Mäuse weisen eine deutlich geringe Plasmakonzentration auf, wie untergeordnet Weibchen (Williamson et al., 2019).

Das Alter hat ebenfalls einen Einfluss auf die Corticosteronkonzentration. Im Ruhezustand (7 Uhr) wurde bei 23 Monate alten Mäusen im Vergleich zu 2 Monaten jungen Mäusen kein Unterschied festgestellt. Am zirkadianen Höhepunkt (19 Uhr) jedoch haben die älteren Mäuse eine deutlich höhere Corticosteronkonzentration im Plasma, als die jüngeren Mäuse. Wohingegen die jungen Mäuse eine deutlich höhere Corticosteronkonzentration nach einer Stressindikation (Fixierungsstress) aufweisen, als die älteren Mäuse. Um eine Aussage über die Aktivität der HPA-Achse zu treffen, wurde die Expression der Glucocorticoid Rezeptoren mittels Western Plot gemessen. Hier konnte kein Unterschied in der Expression zwischen jungen und alten Mäusen festgestellt werden (Oh et al., 2018).

Ein weiterer Faktor, der bei der Auswertung berücksichtigt werden muss, ist der Stamm. Verschiedene Mausstämme haben von Natur aus unterschiedliche Corticosteronkonzentrationen. Bei der Untersuchung von weiblichen Mäusen des C57BL/6 und Swiss Stammes wurde ein Unterschied festgestellt. Die Plasmakonzentration von Corticosteron im Ruhezustand ist bei dem C57BL/6 Stamm deutlich höher, als bei dem Swiss Stamm. Wohingegen die Glucocorticoid Rezeptor Expression im Hippocampus gegenteilig ist (Marchette et al., 2018). Der Swiss Stamm exprimiert deutlich mehr Glucocorticoid Rezeptoren, wie der C57BL/6 Stamm. Die Reaktion auf einen Stressreiz zeigt, dass die Konzentration bei C57BL/6 und Swiss Mäusen ansteigt. Ein statistischer Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden. 21 Tage nach dem Stressreiz sinkt die Corticosteronkonzentration im Plasma bei den C57BL/6 Tieren. Diese ist sogar geringer als im Ruhezustand. Im Gegensatz dazu liegt die Konzentration bei dem Swiss Stamm immer noch über dem Ruhezustand liegt (Tsuchimine et al., 2020). Ähnliche Werte weisen auch die männlichen Mäuse des B6 Stammes auf. Sie wurde nach einer Stressindikation eine 6-fach höhere Corticosteronkonzentration in den Haaren nachgewiesen. Wohingegen bei männlichen BALB/cAJcl Tieren eine 16-fach höhere Konzentration nachgewiesen wurde (Tsuchimine et al., 2020).

Diverse Umwelteinflüsse (Ernährung (Sirasangi et al., 2024), Käfiganreicherungen (Benaroya-Milshtein et al., 2004), Gruppengröße/Hierarchie (Williamson et al., 2019), Lärm (Clancy et al., 2023), Lichtintensität (Dauchy et al., 2019), Hell-Dunkel-Zyklus sowie Zeitpunkt der Probenentnahme (Kalsbeek et al., 2012), Handhabungsmethoden (Hurst and West, 2010), usw.) dürfen bei der Auswertung ebenfalls nicht unberücksichtigt bleiben. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zahlreiche Faktoren wie Geschlecht, Alter, Stamm, zirkadianer Rhythmus, Hierarchie und Art der Probe die Konzentration von Corticosteron beeinflussen.

Obwohl die Bestimmung der Corticosteronkonzentration von diversen Faktoren beeinflusst werden kann, wird sie trotzdem als Biomarker bei Nagetieren verwendet, um Rückschlüsse auf deren Stresshormonspiegel zu ziehen (Ataallahi et al., 2022). Ein Anstieg der Corticosteronkonzentration wird oftmals zur Bewertung des Wohlbefindens genutzt (Botia et al., 2023). Dabei spielt der auslösende Reiz eine entscheidende Rolle. Verursacht der Reiz Schmerzen oder Angst bei dem Tier, wird dieser als Verschlechterung des Wohlbefindens interpretiert (Tsai et al., 2015, Tsuchimine et al., 2020). Ein Anstieg an Plasmacorticosteron kann aber gleichermaßen auf Belohnung oder Angst hinweisen. Die Aktivierung der HPA-Achse hat nicht unbedingt negative Folgen für das Wohlbefinden der Tiere (Ralph and Tilbrook, 2016). So zeigen Mäuse, die in einem angereicherten Käfig gehalten werden, im Vergleich zu einem Standardkäfig signifikant erhöhte Corticosteronwerte (Benaroya-Milshtein et al., 2004, Ratuski et al., 2024).

Aufgrund der Einschränkungen und der Schwankungen im Hormonspiegel reicht die Auswertung der Corticosteronkonzentration nicht aus, um verlässliche Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Tiere zu ziehen (Leenaars et al., 2020). Daher soll das Verhalten der Tiere zusätzlich analysiert werden, um eine umfassendere Einschätzung ihres Wohlbefindens zu ermöglichen (Hohlbaum et al., 2018). Diese Verhaltensanalyse ergänzt die physiologischen Parameter und ermöglicht eine präzisere Beurteilung des tatsächlichen Wohlbefindens der Nagetiere.

1.8 QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES STRESSHORMONS MITTELS IMMUNOASSAY

Anhand der Bestimmung von Corticosteron kann der Stresszustand von Nagetieren und so das Wohlbefinden ermittelt werden (Hirsch and Watkins, 2020). Wie bereits erwähnt gibt es verschiedene Proben die zur Bestimmung genutzt werden können. Die häufigste genutzte Probe zur Analyse von akutem Stress sind Blutproben. Hierbei sollte berücksichtigt werden, ob es sich um Plasma oder Serum handelt. Je nachdem welche Schritte folgen, muss das Probengefäß, in denen das Blut gesammelt wird, ein Antikoagulat enthalten. Genauso wichtig ist die anschließende Lagerung bei Raumtemperatur, Kühlschrank (- 4 °C) oder Gefrierschrank (- 20/- 80 °C). Diese ist abhängig von der weiteren Verarbeitung und wann diese zeitlich stattfindet. Am besten eignet sich die Lagerung bei -80 °C. Diese garantiert die längste Haltbarkeit der Proben (Hansen, 2015). Bevor die Proben mittels Enzyms gekoppeltem Immunabsorptionstest (ELISA) bestimmt werden können, muss das Corticosteron zuvor noch aus den Proben extrahiert werden. Dies ermöglicht es, das Corticosteron zu konzentrieren und andere Bestandteile zu entfernen (Ataallahi et al., 2022). Um die Konzentration zu bestimmen, gibt es verschiedene Methoden. Welche Methode (z.B. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie, Fluoreszenzdetektion, Immunoassay) genommen wird, ist abhängig von den eigenen Präferenzen und den Gegebenheiten im Labor. Es ist lediglich darauf zu achten, dass es eine Spezifität und Sensitivität für Corticosteron gegeben ist. Die gebräuchlichste Methode ist der Immunoassay. Er basiert auf dem Prinzip der Bindung zwischen einem Antikörper und der zu bestimmenden Probe. Zum Immunoassay gehören ebenfalls verschiedene Methoden wie der enzymgekoppelte Immunabsorptionstest (ELISA), Radioimmunoassay (RIA) und der Multiplex Immunoassay (Ataallahi et al., 2022). Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile. Früher wurde der Radioimmunoassay sehr oft genutzt, um die Konzentration zu bestimmen. Jedoch sind für diese Methode radioaktive Substanzen notwendig, die einen Einfluss auf die Umwelt und Sicherheit des Anwenders haben können (Mallick et al., 2015). Bei einem ELISA werden keine radioaktiven Substanzen benötigt. Dieser ist sehr einfach in der Anwendung und schnell, ermöglicht jedoch nur die Bestimmung eines Analyten (z. B. Corticosteron) mittels ELISA.

Sollen mehrere Analyten bestimmt werden, ist das mit einem ELISA kosten- und zeitintensiv. Dafür eignet sich Multiplex Immunoassay, wie Durchflusszytometrie, Chemilumineszenz oder Elektrochemilumineszenz (Leng et al., 2008). Der Nachteil dieser Methode ist, dass spezifisches Equipment und Erfahrung benötigt werden (Ataallahi et al., 2022).

1.8.1 CORTICOSTERON NACHWEIS MIT ENZYMGEKOPPELTEM IMMUNABSORPTIONSTEST (ELISA) VON ENZO

In dieser Studie wird die Corticosteronkonzentration im Blutplasma von Mäusen mittels kompetitiver ELISA ausgewertet. Mit dieser Methode kann das gebundene Corticosteron mittels Absorption bei 405 nm nachgewiesen werden. Bei einem kompetitiven ELISA bindet ein nicht markierter Antikörper (Esel-Antikörper) an einem festen Träger, z. B. der Platte. Ein zweiter, markierter Antikörper (Anti-Schaf) bindet an den ersten Antikörper. Dadurch lassen sich das Signal und die Sensitivität (zwei Bindungsstellen am Antikörper) verstärken, was bei geringen Konzentrationen von Vorteil ist. Der Anti-Schaf-Antikörper, das bekannte Antigen mit dem Enzym (alkalische Phosphatase [AP]) und das unbekannte Antigen, dem Corticosteron, werden gleichzeitig in die mit Esel-Antikörper beschichtete Platte pipettiert. Während der Inkubationszeit kann der Anti-Schaf Antikörper an den Esel-Antikörper binden. Das Corticosteron der unbekannt Probe konkurriert mit dem enzymgekoppelten Antigen, um die Bindungsstelle am Antikörper. Unspezifische Bindungen werden vermieden und nichtgebundene Antigene werden beim Waschen entfernt. Je mehr von der unbekannt Probe (Corticosteron) gebunden hat, desto weniger kann von der bekannten Probe, dem enzymgekoppelten Antigen, binden. Je niedriger die Absorption ist, umso geringer ist der Farbumschlag (Kenneth Murphy, 2011, ENZO, 26.01.2023) und umso höher ist die Corticosteronkonzentration in der Probe.

Kompetitiver ELISA

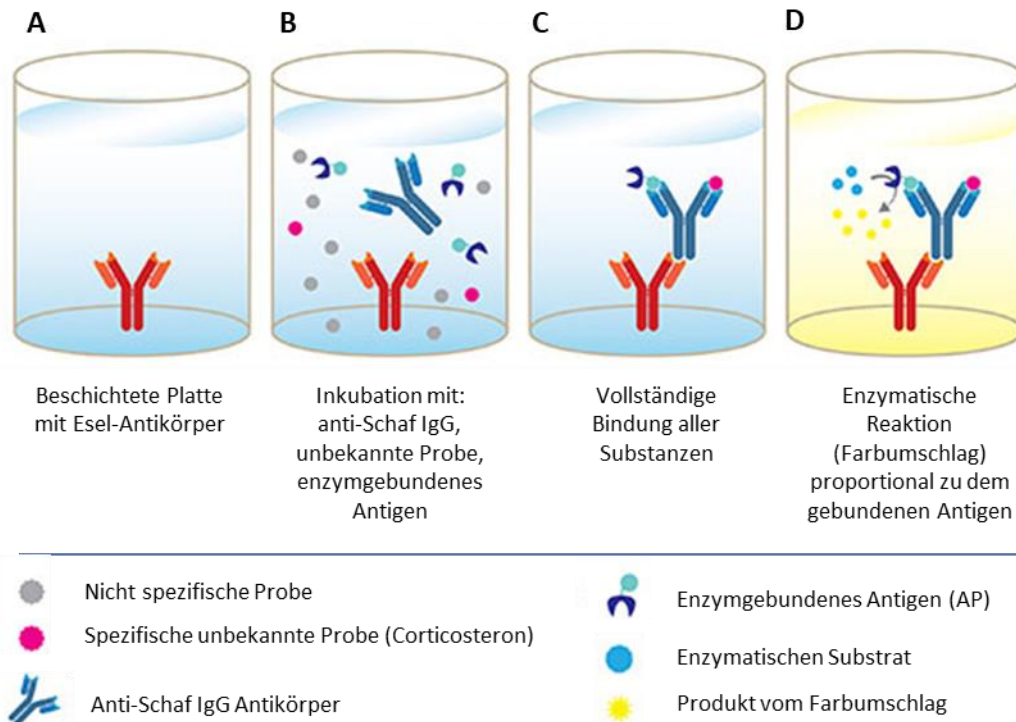


Abbildung 8: Graphische Darstellung eines kompetitiven, enzymgekoppelten Immunabsorbtiestests. (A) Beschichtete Platte mit Esel-Antikörper (Donkey antibody). **(B)** Alle Substrate werden in die Platte pipettiert. Der Anti-Schaf IgG Antikörper verbindet sich während der Inkubation sowohl mit dem Esel-Antikörper als auch mit dem enzymgebundenen Antigen und der unbekanntem Corticosteronprobe. **(C)** Alle Bindungen sind vollständig. Nach Zugabe des enzymatischen Substrates, kann das Enzym das Substrat umsetzen und es kommt zum Farbumschlag **(D)**. Dieser Farbumschlag kann mit Hilfe eines Absorptionmessgerätes bestimmt werden (ENZO, 26.01.2023).

1.9 VERHALTENSTESTS BEI MÄUSEN – INDIKATOR FÜR DEREN WOHLBEFINDEN

Die quantitative Bestimmung des Corticosteron ist nur ein kleiner Teil, um Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Tiere zu ziehen. Aufgrund der Einschränkungen und der Schwankungen im Hormonspiegel reicht die Auswertung der Corticosteronkonzentration nicht aus (Leenaars et al., 2020). Die Beobachtung des Verhaltens der Tiere dient als Indikator für deren Wohlbefinden. Regelmäßige Beobachten sind essenziell und zeigen Abweichungen von deren Normalverhalten und Anzeichen von Stress, Schmerzen oder Unwohlsein (Rinwa et al., 2024). Daher soll das Verhalten der Tiere zusätzlich analysiert werden, um eine umfassendere Einschätzung ihres Wohlbefindens zu ermöglichen (Hohlbaum et al., 2018). Diese Verhaltensanalyse ergänzen die physiologischen Parameter und ermöglichen eine präzisere Beurteilung des tatsächlichen Wohlbefindens der Nagetiere.

1.9.1 INTERAKTIONSTEST ODER TEST AUF INTERKATION (TAI)

Der Test auf Interaktion wertet die Zeit aus, die das Tier freiwillig mit der Interaktion des Wissenschaftlers verbringt. Zur Interaktion zählen das Beschnüffeln (sniffing) der Hand, das Berühren (touching) der Hand oder das darauf Klettern (climbing). Das Tier hat 60 Sekunden lang Zeit, sich an die neue Situation zu gewöhnen, bis die Hand des Wissenschaftlers flach in den vorderen Teil des Käfigs gelegt wird. Danach kann das Tier für weitere 60 Sekunden mit der Hand des Experimentators interagieren (Hurst and West, 2010). Da dem Tier weiterhin ausreichend Platz zur freien Verfügung besteht, kann es freiwillig zur Hand laufen. Es wird dem Tier überlassen, ob es interagieren möchte. Die Ergebnisse liefern einen Hinweis über das Explorationsverhalten der Tiere. Je länger die Tiere interagieren, desto geringer ist deren Angst-assoziiertes Verhalten. Ängstliche Tiere zeigen ein reduziertes, exploratives Verhalten und Erstarren. Die Interaktionszeit ist bei nicht ängstlichen Tieren länger und somit deren Wohlbefinden verbessert (Gouveia and Hurst, 2013, Gouveia and Hurst, 2019).

1.9.2 ERHÖHTES PLUSLABYRINTH TEST (EPM)

Das erhöhte Pluslabyrinth ist ein Verhaltenstest zur Bestimmung von Angst-assoziiertem Verhalten (Figueiredo Cerqueira et al., 2023). Das Labyrinth steht auf einer erhöhten Plattform und besteht aus einem geschlossenen und offenen Arm. Die Tiere, welche explorativer und weniger Angst-assoziiertes Verhalten zeigen, werden sich länger in den offenen Armen aufhalten. Des Weiteren sind die Tiere aktiver und legen eine längere Laufstrecke zurück (Clarkson et al., 2018). Im Gegensatz dazu verweilen die ängstlichen Tiere länger in geschützten Bereichen und bleiben in einer Ecke sitzen. Das sitzen bleiben wird auch als eingefrorenes oder auch „freezing“ Verhalten bezeichnet. Durch diesen Test werden das Angst-assoziierte Verhalten sowie deren Aktivität (Aufenthaltsdauer im offen/geschlossenen Arm, die Laufstrecke) bestimmt (Radyushkin et al., 2009). Es ist nachgewiesen, dass Tiere, die am Schwanz gehandhabt werden, ein größeres Angst-assoziiertes Verhalten, eine geringere Laufstrecke, sowie eine kürzere Interaktionszeit mit dem Experimentator zeigen. Die aversive Handhabung (negativer Reiz) hat einen negativen Einfluss auf das Wohlbefinden der Tiere (Clarkson et al., 2018).

1.9.3 OFFENER FELD TEST

Mittels des offenen Feld Tests können ähnliche Parameter bestimmt werden. Auch dieser Test bewertet das Angstverhalten der Tiere. Die Maus wird in eine Box gesetzt und nach einer

bestimmten Zeit wieder herausgeholt. Die Box ist aufgeteilt in ein Zentrum und eine Randzone. Die Tiere, welche explorativer sind und weniger Angst-assoziiertes Verhalten zeigen, legen eine längere Laufstrecke zurück und halten sich im Zentrum der Box auf (Radyushkin et al., 2009). Ein längerer Aufenthalt im Zentrum der Box ist ein Indikator für ein reduziertes angstähnliches Verhalten und trägt somit zu einer Verbesserung des Wohlbefindens bei (Clarkson et al., 2018, Figueiredo Cerqueira et al., 2023). Eine Studie zeigte, dass Ratten, die täglich auf einem Laufband ein Intervalltraining absolvierten, weniger angstähnliches Verhalten zeigten und eine längere Laufstrecke im OF zurücklegten. Das „freezing“ Verhalten nahm deutlich ab, im Vergleich zu den Ratten, welche nicht auf das Laufband durften. Diese Studie zeigt, dass intensives Training positive Effekte auf das Verhalten der Ratten hat (Çalışkan et al., 2024).

1.9.4 NESTBAUVERHALTEN (NBT)

Das Nestbauverhalten bei männlichen und weiblichen Mäusen ist ein angeborenes, natürliches Verhalten. Ist das Verhalten reduziert, kann das das erste Anzeichen für Verhaltensänderungen oder psychiatrische Störungen sein. Veränderungen im Nestbau können daher dazu beitragen, den Wohlbefindenzustand der Maus zu bestimmen (Jirkof, 2014, Neely et al., 2019). Die Komplexität eines Nestes, lässt Rückschlüsse auf das Wohlbefinden zu (Jirkof et al., 2013). Sie brauchen die Nester für ihre Wärmeregulation, als Unterschlupf und für die Fortpflanzung. Zu wenig Nestmaterial kann die Sterberate der Nachkommen begünstigen (Leidinger et al., 2019). Das am häufigsten verwendete Material zur Bestimmung des Nestbauverhaltens sind gepresste Baumwollquadrate, welche die Mäuse auseinanderzupfen können. Diese bleiben über Nacht im Käfig und werden am nächsten Morgen evaluiert. Die Evaluierung erfolgt mittels 5 Punkte System. Das schlechteste Nest erhält lediglich einen Punkt, während das beste Nest mit 5 Punkten bewertet wird (Deacon, 2006). Wie gut ein Nest gebaut wird, hängt von diversen Faktoren ab. Die Dauer, das Nestmaterial, das Geschlecht sowie der Stamm, die Tageszeit, das Alter und die Umgebungstemperatur können nachweislich die Bauweise der Nester beeinflussen.

Je länger die Tiere das Nestmaterial zur Verfügung haben, desto qualitativ hochwertigere Nester (Nester mit hohem Score) können gebaut werden (Hess et al., 2008). Das Material, welches den Tieren zum Nestbau angeboten wird, beeinflusst die Qualität des Nestes. Es wurde gezeigt, dass die höchste Qualität der Nester erreicht wird, wenn geschredderte Papierstreifen (8 g Sizzle Nest) verwendet werden, im Gegensatz zu den Tieren, die lediglich zwei Kleenex-Tücher erhielten. Mäuse die gepresste Baumwollquadrate erhalten hatten, zeigten statistisch keine Unterschiede. Jedoch war der Nestbau Score geringer, wie bei den

Mäusen die nur die Kleenex Tücher hatten. Die Mäuse können mit Kleenex Tüchern alleine keine qualitativ hochwertigen Nester bauen, insbesondere wenn das Material noch begrenzt ist. Die schlechten Ergebnisse für die Baumwollquadrate können möglicherweise darauf hindeuten, dass nicht genügend Material vorhanden ist. Zu berücksichtigen ist, dass die Mäuse keine Unterschiede im Nest Score zeigten, wenn ihnen mehrere Baumwollquadrate zu Verfügung stehen (Hess et al., 2008). Einen Unterschied zwischen den Geschlechtern, konnten diese Studien (Hess et al., 2008, Xiong et al., 2018) nicht nachweisen. Sowohl weibliche als auch männliche Mäuse bis zu einem Alter von 7 Monaten bauen hochwertige Nester. Lediglich trächtige Weibchen bauen Nester mit höherem Score. Eine gesteigerte Aggression zwischen den männlichen Tieren bezüglich begrenzter Ressourcen konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil, je besser das Nest, desto weniger Aggressionen innerhalb der männlichen Gruppe (Gaskill et al., 2013). Unter Berücksichtigung des Stammes, konnten verschiedene Scores nachgewiesen werden. Selbst innerhalb der Inzuchtstämme (C57BL/6JRccHsd, DBA/2JRccHsd, 129S2/SvHsd) lassen sich Unterschiede nachweisen (Ahlgren and Voikar, 2019).

Ein weiterer Faktor, der die Qualität des Nestes beeinflussen kann, ist die Tageszeit. Bei männlichen Mäusen des C57BL/6J Stammes wurde nachgewiesen, dass sie bevorzugt in der frühen und späten Dunkelphase Nester bauen, was mit der Schlafphase zusammenhängt (Tagawa et al., 2024).

Das Alter hat ebenfalls einen Einfluss auf das Verhalten. Jüngere Mäuse (7 Monate) bauen statistisch qualitativ bessere Nester, als ältere Mäuse (25 Monate). In dieser Studie wurde ebenfalls kein geschlechtsspezifischer Unterschied bei 7 Monate alten Mäusen festgestellt. Bei 25 Monate alten Mäusen jedoch bauen die weiblichen Mäuse statistisch qualitativ hochwertigere Nester, als die männlichen Mäuse. Je älter die Tiere werden, desto niedriger der Nestbau Score (Xiong et al., 2018).

Die Nester werden an die Umgebungstemperatur angepasst. Mit steigender Umgebungstemperatur nimmt der Nestbau Score ab. Die Qualität der Nester verschlechtert sich, da die Wände immer flacher und offener werden, wodurch die Tiere mehr Wärme abgeben können (Gaskill et al., 2013).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die täglich aktiven Mäuse (auf einem Laufband), einen höheren Nestbau-Score aufwiesen als die inaktiven Mäuse (Yuk et al., 2023). Auch hier zeigt intensives Training einen positiven Effekt auf das Nestbauverhalten der Mäuse.

1.9.5 SACCHAROSE PRÄFERENZ TEST (SPT)

Der Saccharose Präferenz Test ist der fünfte Test der durchgeführt wird, um das depressionsbedingte oder anhedonische Verhalten bei Mäusen zu bestimmen (Wulff et al., 2023). Anhedonie ist die Unfähigkeit, Freude an etwas zu empfinden und ist das erste Symptom einer Depression beim Menschen (Liu et al., 2018).

Bei diesem Test wird den Tieren die Möglichkeit geboten, zwischen Wasser und einer Saccharoselösung frei zu wählen (Strekalova et al., 2004). Ein normaler Saccharosekonsum ohne vorherige Indikationen liegt bei Mäusen um die 80 % (Du Preez et al., 2020). Nach einer Stressindikation nimmt der Konsum ab. Mäuse, die einem chronischen Stressreiz ausgesetzt werden, zeigen eine reduzierte Saccharose Präferenz (Diez-Solinska et al., 2024). Eine reduzierte Saccharosepräferenz unter < 60 % dient als Marker für anhedonisches Verhalten (Liu et al., 2018). Wobei die Präferenzen auch stark schwanken (Primo et al., 2023). Nicht nur die Präferenz, sondern auch die Gedächtnisleistung ist beeinträchtigt, was zu einer reduzierten Trinkhäufigkeit führt (Wulff et al., 2023). Ein akuter Stressor hemmt die Saccharoseaufnahme nicht, wohingegen der chronische Stress die Aufnahme reduziert. Weibliche Mäuse zeigen nach dem chronische Stressreiz eine reduziertes Trinkverhalten und somit eine reduzierte Saccharoseaufnahme, jedoch sind diese statistisch nicht unterschiedlich. Das lässt darauf Schlussfolgern, dass die weiblichen Tiere stressresistenter und weniger anfällig sind in Bezug auf die Saccharose Aufnahme. Im Gegensatz zu den männlichen Mäusen, die nach dem chronischen Stress statistisch deutlich weniger Saccharose zu sich nehmen (Wulff et al., 2023). Ein großer Nachteil des Saccharose Präferenz Tests, ist es, dass es keine einheitlichen Geräte zur Messung gibt. Es werden oft Röhren mit Gummistopfen verwendet, um die Aufnahme der Saccharose abzuschätzen. Hierbei können jedoch diverse Fehlerquellen entstehen. Die Röhren können undicht werden, was die Messung verfälschen kann. Die Menge an Saccharoselösung ist entscheidend, ob die Tiere ein anhedonisches Verhalten zeigen oder nicht. Die absolute Menge kann jedoch vom Gewicht der Tiere abhängig sein und kann erheblich schwanken. Des Weiteren entscheiden sich die Mäuse manchmal dazu, weder Wasser noch Saccharose oder sogar beides in extrem großen Mengen zu trinken. Der nicht bzw. übermäßige Konsum führt ebenfalls zur Verfälschung der Messung (Liu et al., 2018).

Um die Ergebnisse genauer deuten zu können, ist ein weiterer Test notwendig, um eine Aussage über das depressionsbedingte Verhalten bei Mäusen zu treffen. Dieser Test ist der Schwimmtest, welcher in den folgenden Abschnitten beschrieben wird.

1.9.6 SCHWIMMTEST (FST)

Der Schwimmtest oder auch „*Forced swim test*“ genannt dient ebenfalls der Bewertung des depressionsbedingten Verhaltens (Verzweiflung). Bei dem FST wird die Maus in ein Gefäß mit temperiertem Wasser gesetzt, aus dem sie nicht alleine herauskommen kann. Nach Ablauf der Zeit wird das Schwebeverhalten ausgewertet. Mäuse, die frühzeitig beginnen im Wasser zu schweben oder sich treiben lassen, zeigen eine passive Bewältigungsstrategie. Mäuse, die versuchen, aus dem Gefäß herauszukommen und weiter schwimmen, wenden eine aktive Bewältigungsstrategie an. Der FST liefert daher Hinweise darauf, wie effektiv die Bewältigungsstrategie der Mäuse ist. Stressvolle Situationen fördern die passiven Bewältigungsstrategien bei Mäusen. Beim Menschen führt chronischer Stress zu Depression, was dazu führt, dass die passive Bewältigungsstrategie oft als depressionsassoziiertes Verhalten bezeichnet wird (Commons et al., 2017). Die Tiere zeigen oftmals jedoch nur frustriertes Verhalten oder emotionale Erschöpfung, was wiederum als depressiv ähnlichem Verhalten gewertet wird. Die Auswertung von diesem Verhalten (Schwebeverhalten) lässt Rückschlüsse auf den Zustand (Verzweiflung) der Tiere zu (Strekalova et al., 2004). Männliche Inzuchtmäuse die einem Stressreiz ausgesetzt waren, zeigen eine deutlich längere Immobilitätsdauer als Inzuchtmäuse ohne Stressindikation (Zhang et al., 2020). Männliche Auszuchtmäuse hingegen zeigen keinen Unterschied in der Immobilitätsdauer nach einem Stressreiz im Vergleich zu Auszuchtmäuse ohne Stressindikation (Diez-Solinska et al., 2024).

1.10 KÖRPERGEWICHTSMESSUNG ALS INDIKATOR FÜR WOHLBEFINDEN

Das Wohlbefinden der Labornager ist schwierig zu bewerten. Gerade auch weil sie uns nicht sagen können, wo sie Schmerzen empfinden. Die Auswertung von diversen Verhaltenstests der Tiere, ist der erste Schritt das Wohlbefinden zu deuten. Es ist wichtig deren Verhalten genauer zu beobachten. Dadurch können nicht nur Rückschlüsse auf Angst- und Depressionsassoziiertes Verhalten geschlossen werden, sondern auch auf chronische Schmerzen. Diese wiederum können das Wohlbefinden der Tiere minimieren. Tiere, die Schmerzen empfinden, zeigen unter anderem eine verminderte Aktivität, eine abnormale (gekrümmte) Haltung, veränderte Atmung, hörbare Schmerzlaute, verminderte Fellpflege und eine Reduktion des Körpergewichtes durch eine veränderte Fressaktivität (Animals., 1992). Daher sind die Überwachung und Messung des Körpergewichtes der Tiere ein weiterer Indikator zur Deutung des Wohlbefindens (Do et al., 2020). Stress führt sowohl bei juvenilen, als auch bei jungen Mäusen dazu, dass sie deutlich weniger an Gewicht zunehmen (Li et al., 2022).

Nicht nur Stress ist ein Faktor, der das Körpergewicht bei Mäusen stark beeinflussen kann, sondern auch Faktoren wie Alter, Geschlecht, Stamm (Laboratories, Labs, 28.06.2024), Haltungsbedingung (Ahlgren and Voikar, 2019) und Aktivität (Yuk et al., 2023).

2. ZIELSETZUNG – HYPOTHESEN

Das konkrete Ziel dieser Forschungsarbeit ist die Evaluierung des Klickertrainings als Refinementmethode. Einerseits wurde eine einwöchige Protokolldauer angewendet, andererseits wurde untersucht, ob der positive Effekt des Klickertrainings der Mütter auf ihre Nachkommen übertragbar ist. Zusätzlich wurde untersucht, ob ein weiteres Klickertraining den Nachkommen von Vorteil ist oder ob es ausreichend ist, lediglich die Mütter zu trainieren. Das Klickertraining dient der Vorbereitung der Versuchstiere auf folgende Verhaltensexperimente, indem durch die Interaktion mit dem Experimentator und die regelmäßige Handhabung die Angst- und Depressions-assoziierten Verhaltensweisen sowie die Stresshormone reduziert werden sollen. Die Studie von Leidinger et al., 2017 zeigt das trainierte Mäuse eine reduzierte Schwebezeit im Morris Water Maze aufwiesen, was auf ein geringeres Depressions-assoziiertes Verhalten hindeutet. Zudem wurde eine verminderte Vokalisierung während der Handhabung und der Fixierung nachgewiesen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wird in dieser Forschungsarbeit weiter auf die Auswirkungen des Klickertrainings eingegangen. Es wurde die Fragestellung untersucht, wie das Klickertraining optimiert werden kann, um eine nutzerfreundliche Anwendung zu ermöglichen und zu prüfen, ob das bestehende vierwöchige Trainingsprotokoll verkürzt werden kann (Leidinger et al., 2017). Diese Studie besteht aus mehreren Teilen, die ermitteln sollen, ob der positive Effekt des Klickertrainings generationsübergreifende Auswirkungen auf die Mäuse hat. Dabei werden ausschließlich nur die Nachkommen berücksichtigt und nicht die Mütter.

Wie bereits erwähnt, führt das Klickertraining bei Mäusen zu einer Reduktion der Schwebezeit im Morris Water Maze. Daher wird angenommen, dass das Klickertraining Auswirkungen auf die Schwebezeit im Schwimmtest (FST) hat. Im ersten Versuchsteil soll untersucht werden, ob das Klickertraining der Mütter positive Auswirkungen auf das Depressions-assoziiertes Verhalten ihrer Nachkommen hat. Dazu wurden untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) und trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) miteinander verglichen. Es kann auf ein zusätzliches Training der Nachkommen verzichtet werden, wenn die Verhaltenstests ähnliche Ergebnisse liefern. Dies würde bedeuten, dass es ausreichen würde, lediglich das Muttertier zu trainieren, anstatt die 6 - 15 Nachkommen. Der Vorteil wäre eine qualitativ effizientere Anwendung des Klickertrainings. Darüber hinaus soll geprüft werden, ob es geschlechterspezifische Unterschiede (männlich/weiblich) im Klickertraining gibt. Hierfür werden die Ergebnisse der Verhaltenstests von männlichen und weiblichen Nachkommen (M+N- und M+N+) verglichen. Zusätzlich wird die Interaktionszeit mit dem Experimentator gemessen, da eine längere Interaktionszeit auf ein geringeres, Angst-assoziiertes Verhalten hinweisen kann.

1. Hypothese (Beide Geschlechter):

Das gezielte Klickertraining der Mütter, ohne zusätzliches Training ihrer Nachkommen (M+N-), führt im Vergleich zu den trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+), zu einer gleichbleibenden oder sogar signifikant größeren Gewichtszunahme, einer längeren Interaktionszeit mit dem Experimentator, einer erhöhten Saccharoseaufnahme, einem höheren Nestbau Score, einer verkürzten Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und einer geringeren Corticosteronkonzentration.

2. Hypothese (geschlechtsspezifische Trennung):

Die weiblichen Nachkommen (M-N-, M-N+, M+N-, M+N+) zeigen im Vergleich zu männlichen Nachkommen (M-N-, M-N+, M+N-, M+N+) signifikant mehr Trainingsverhalten, eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) sowie eine geringe Corticosteronkonzentration.

Der zweite Versuchsteil baut auf den Erkenntnissen des ersten Teils auf. Neben den bereits durchgeführten Verhaltenstests zur Bestimmung depressionsassoziiertes Verhaltens werden zusätzliche Tests eingeführt, um umfassende Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Tiere zu ziehen. Verhaltenstests, wie der offene Feld Test und das erhöhte Pluslabyrinth sollen insbesondere Aussagen über Angst-assoziiertes Verhalten liefern. Zudem wird untersucht, ob ein gezieltes Klickertraining der Mütter ausreicht, um den positiven Effekt des Klickertrainings auf die Nachkommen zu übertragen, ohne dass diese zusätzlich trainiert werden müssen. Diese Vorgehensweise würde nicht nur erhebliche Zeitersparnisse mit sich bringen, sondern auch das Protokoll nutzerfreundlicher gestalten und es ermöglichen, dass mehr Tiere vom Klickertraining profitieren.

Der zweite Versuchsteil umfasst insgesamt vier Gruppen: untrainierte Mütter mit untrainierten Nachkommen (M-N-), untrainierte Mütter mit trainierten Nachkommen (M-N+), trainierte Mütter mit untrainierten Nachkommen (M+N-) und trainierte Mütter mit trainierten Nachkommen (M+N+). Es wird erwartet, dass die Gruppe der untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) in den Verhaltenstests bessere Ergebnisse zeigt als die trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+). Die Gruppe der untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) dient dabei als Referenzwert für die Ergebnisse ohne Klickertraining. Es wird erwartet, dass alle anderen Gruppen (M-N+, M+N-, M+N+) ebenfalls bessere Ergebnisse in dem Verhaltenstest liefern werden. Zusätzlich soll untersucht werden,

ob eine Verkürzung der Klickereinführungszeit auf 5 Minuten den gleichen Trainingserfolg wie eine 10-minütige Einführungszeit erzielt. Diese verkürzte Einführung würde das Training erleichtern sowie die Quantität steigern. Es könnten mehrere Tiere auf einmal trainiert werden, so dass eine größere Anzahl an Tieren vom Klickertraining profitiert. Alle Ergebnisse werden zudem auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin analysiert.

1. Hypothese (Beide Geschlechter):

Trainierte Nachkommen (M-N+, M+N+) zeigen keine signifikante Reduktion ihres Körpergewichtes im Vergleich zu untrainierten Nachkommen (M-N-, M+N-).

2. Hypothese (Beide Geschlechter):

Das gezielte Klickertraining der Mütter, ohne ihre Nachkommen zu trainieren (M+N-) zeigt im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) und trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) signifikant eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

3. Hypothese (Beide Geschlechter):

Das gezielte Klickertraining der Mütter, ohne ihre Nachkommen zu trainieren (M+N-) zeigt im Vergleich zu trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) die gleiche oder signifikant eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

4. Hypothese (Beide Geschlechter):

Trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) zeigen im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) gleiche oder signifikant mehr Trainingsverhalten, eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine

kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

5. Hypothese (Beide Geschlechter):

Trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) zeigen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) signifikant eine länger Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

6. Hypothese (geschlechtsspezifische Trennung):

Die weiblichen Nachkommen (M-N-, M-N+, M+N-, M+N+) zeigen im Vergleich zu männlichen Nachkommen (M-N-, M-N+, M+N-, M+N+) signifikant mehr Trainingsverhalten, eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

7. Hypothese (Beide Geschlechter):

Eine Reduktion der Einführungszeit auf 5 Minuten zeigt die gleichen oder signifikant mehr Trainingserfolge wie eine 10-minütige Einführungszeit. Dies wird dadurch überprüft, indem das Trainingsverhalten vom zweiten Versuchsteil mit dem Trainingsverhalten vom ersten Versuchsteil von trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) verglichen wird.

Der dritte Teil dieser Studie untersucht, ob eine Wiederholung des Klickertrainings der Mütter zu einer deutlicheren Reduktion der angst- und depressionsassoziierten Verhaltensweisen der Nachkommen führt. Da jedes Tier individuell ist, können sie nicht alle gleich behandelt werden. Wir vermuten, dass eine Wiederholung des Klickertrainings der Mütter bei ängstlicheren Tieren besonders vorteilhaft sein könnte, um deren angst- und depressionsassoziierten Verhaltensweisen zu verbessern. Zudem werden alle Ergebnisse auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin analysiert.

1. Hypothese (Beide Geschlechter):
Trainierte Nachkommen (M-N+, M+N+) zeigen keine signifikante Reduktion ihres Körpergewichtes im Vergleich zu untrainierten Nachkommen (M-N-, M+N-).

2. Hypothese (Beide Geschlechter):
Das gezielte Klickertraining der Mütter, ohne ihre Nachkommen zu trainieren (M+N-) zeigt im Vergleich zu untrainierten (M-N-) und trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) signifikant eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

3. Hypothese (Beide Geschlechter):
Das gezielte Klickertraining der Mütter, ohne ihre Nachkommen zu trainieren (M+N-) zeigt im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) gleiche oder signifikant eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

4. Hypothese (Beide Geschlechter):
Trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) zeigen im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) gleiche oder signifikant mehr Trainingsverhalten, eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Testes (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringer Corticosteronkonzentration.

5. Hypothese (Beide Geschlechter):
Trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) zeigen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) signifikant eine

längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

6. Hypothese (geschlechtsspezifische Trennung):

Die weiblichen Nachkommen (M-N-, M-N+, M+N-, M+N+) zeigen im Vergleich zu den männlichen Nachkommen (M-N-, M-N+, M+N-, M+N+) signifikant mehr Trainingsverhalten, eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

7. Hypothese (Beide Geschlechter):

Die trainierten Nachkommen von zweimal trainierten Müttern (Protokoll B: M+N+) zeigen im Vergleich zu den Nachkommen von Müttern, die nur einmal trainiert wurden (Protokoll A: M+N+) signifikant mehr Trainingserfolge.

Jeder Mausstamm und jedes Geschlecht reagieren unterschiedlich auf das Klickertraining und erfordern eine Anpassung des Protokolls. Der vierte Teil dieser Arbeit widmet sich der Untersuchung möglicher stammspezifischer Unterschiede im Klickertraining. Im Fokus steht die Frage, ob der positive Effekt des Klickertrainings auch auf andere Stämme, insbesondere den C57BL/6JRj Stamm, übertragen werden kann. Es soll erforscht werden, ob das Klickertraining in der Lage ist, angst- und depressionsassoziierte Verhaltensweisen zu reduzieren, welches uns mögliche Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Tiere liefern kann. Abschließend wird das Trainingsverhalten des Inzuchtstammes (C57BL/6JRj) mit dem des Auszuchtstammes (Crl:ICR(CD1) aus den vorherigen Versuchen verglichen.

1. Hypothese (Beide Geschlechter):

Trainierte Nachkommen (M-N+, M+N+) zeigen keine signifikante Reduktion ihres Körpergewichtes im Vergleich zu untrainierten Nachkommen (M-N-, M+N-).

2. Hypothese (Beide Geschlechter):

Das gezielte Klickertraining der Mütter, ohne ihre Nachkommen zu trainieren (M+N-) zeigt im Vergleich zu trainierten (M-N+) und untrainierten Nachkommen von

untrainierten Müttern (M-N-) signifikant eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

3. Hypothese (Beide Geschlechter):

Das gezielte Klickertraining der Mütter, ohne ihre Nachkommen zu trainieren (M+N-) zeigt im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) gleiche oder signifikant längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

4. Hypothese (Beide Geschlechter):

Trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) zeigen im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) signifikant mehr Trainingsverhalten, eine längere Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPM) sowie im Zentrum des offenen Feld Tests (OF), eine größere Aufnahme an Saccharoselösung, einen höheren Nestbau Score, eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) und eine geringere Corticosteronkonzentration.

5. Hypothese (geschlechtsspezifische Trennung):

Trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) des C57BL/6JRj Stammes zeigen im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) des CrI:CD1(ICR) Stammes die gleiche Anzahl an Trainingserfolgen.

3. MATERIAL UND METHODE

Tabelle 2: Materialliste

Produkt	Hersteller	Sonstiges
AutoPole2	Manfrotto, Cassola Norditalien	Seriennummer: 432 - 2.7, 1,5 - 2,7 M Silber
Barriere Hauben - Basic	Mölnlycke Health Care GmbH, Wagenseilgasse 14, A-1120 Wien	REF 42013, green
Becherglas	VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, D-64295 Darmstadt	Höhe: 240 mm, Durchmesser: 120 mm, Volumen 2000 ml, Artikelnummer 213 - 0470
Camcorder (Videokamera)	Sony, Japan	4K, SONFDRA53BL, Auswertung: FST
Camcorder (Videokamera)	Sony, Japan	CX240E HANDYCAM® MIT HD UND CMOS SENSOR, Auswertung: EPM, OF
Corticosterone ELISA kit	Enzo Life Science, Inc. 10 Executive Blvd, Farmingdale, NY 11735 USA	ADI-900-097 (96 wells) / ADI-901-097 (5 x 96 wells)
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH + Co.KG, Schoemperlenstr. 3-5, D- 76185 Karlsruhe	Artikelnummer 9097.1, ≥ 99,5 % RNase/DNase frei, 1 kg
Doppelspatel 300 mm	Carl Roth GmbH + Co.KG, Schoemperlenstr. 3-5, D- 76185 Karlsruhe	YK60.1
Einstreu	Rettenmaier & Söhne GmbH, Holzmühle 1 D- 73494 Rosenberg	SAFE FS 14, Artikelnummer 1505 - 298
Einweg- Wägeschalen	VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, D-64295 Darmstadt	85 x 85 x 24 mm (L x B x H), 100 ml

Produkt	Hersteller	Sonstiges
Elevated Plus Maze	Eigenherstellung	65 x 65 x 62 cm (L x B x H)
Ethanol 100 % (Nutzung: verdünnt 70 %) zur Reinigung	AppliChem GmbH, Ottoweg 4 D-64291 Darmstadt	Artikelnummer 147194.0716
Etho Vision XT	Noldus, Wageningen, Niederlande	Software, Version: 15.0.1418
Filterdeckel für Typ II lang GM500	Tecniplast, Italien; Sealsafe® Plus	
Gitter für Typ II lang GM500	Tecniplast, Italien; Sealsafe® Plus	
Handschuhe	Medline Internationaol Frace SAS, 5 rue Charles Lindbergh, 44110 Châteaubriant, Frankreich	SensiCare Ice Powder-Free Nitril Exam Gloves, Größe S, REF 486801
Handtuchpapier	Zick/Zack	2 - lagig, 24 x 21 cm, Luxus Premium hochweiss Artikelnummer 1224233
i-control™ 2.0	Tecan Group Ltd. Männedorf, Schweiz	Software zu Messung der Absorption Version: 2.0, Dokument Artikelnummer 30125941 (2017)
Infinite® 200 Pro Platten-Leser	Tecan Group Ltd. Männedorf, Schweiz	
Intervall Timer für Mobiltelefone	Dreamspark (03.12.2022)	Applikation (App): Anwendungssoftware für Mobilgeräte
Käfigschalen Typ II lang GM500	Tecniplast, Italien; Sealsafe® Plus	Polyphenylsulfon, 36,5 x 21 x 14 cm (L x B x H)
Käfigschalen Typ II, Gitter und Filterdeckel	ZOONLAB GmbH, Animal Husbandry Experts Hermannstraße 6, D- 44579 Castrop-Rauxel	26 x 20 x 14 cm (L x B x H)
Leukosilk	BSN medical GmbH	

Produkt	Hersteller	Sonstiges
Luxmeter digital	Voltcraft (Eigenmarke von Conrad), D-92242 Hirschau	LX - 1108, Messbereich: 0 - 400000 lx
Markierungspunkte	AVERY, Zweckform	Ø 8 mm, klebend
Maus – Zucht – Pellets (Alleinfuttermittel für Mäuse (& Ratten))	sniff Spezialdiäten GmbH, Ferdinand-Gabriel Weg 16, D-59494 Soest	V1124 - 300, 10 mm, autoklavierbar, Abpackung 10 kg
Medizinische Gesichtsmaske mit Ohrschlaufe	DACH Schutzkleidung GmbH Co.KG, Rotachertsraße 21 D-76437 Rastatt	Model D Loop, REF 2161, Typ II R; EN 14683:2019
Micro-Probengefäß EDTA K3E, 1,3 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Sarstedtstraße 1, D-51588 Nümbrecht	Bestellnummer 41.1504.005 Micro-Probengefäß EDTA K3E, venöse Blutentnahme, Präparierung: K3 EDTA, Nennvolumen: 1,3 ml, (L x Ø) mit Verschluss: 44 x 10,8 mm, Eindrückstopfen, Verschluss: rot, Farbcode EU, mit Kunststoffetikett, Etikett / Druck: rot, Spitzboden mit Stehrand, 100 Stück / Beutel
MRXII/ICXD 3360 Plattenlesegerät	Dynex Technologies GmbH, Heerweg 15, D-73770 Denkendorf	
Nestlets	Datesand Ltd, 7 Horsfield Way, Bredbury, United Kingdom	Vertrieb: PLEXX, Artikelnummer 14010, Größe: 5 x 5 cm
Ominfix®-F	B Braun Melsungen AG, Carl-Braun-Straße 1, D-34212 Melsungen	Artikelnummer: 9161406V, Feindosierungsspritzen, 1 ml, ohne Kanüle, 3 – teilig
Open Field Box	Eigenbau	40 x 40 x 40 cm (L x B x H)

Produkt	Hersteller	Sonstiges
Parafilm M®	Bemis Company, Inc., 2200 Badger Avenue, 2968 Oshkosh, WI 54904 USA	Laborverpackungsfolie, Bemis™ HS234526A
Permanentstift (Edding)	edding International GmbH, Bookkoppel 7 D-22926 Ahrensburg	Farbe: Schwarz, Blau, Grün, Rot
Pipetten	Eppendorf SE Barkhausenweg 1 D-22339 Hamburg	1000 µl, 300 µl, 200 µl, 10 µl
Präzisionswaage	Satorius Weighing Technology GmbH, D- 37079 Götting	ED822 - CW, Max 820 g, d = 0,01 g, 27303955
PyRAT – Software für Versuchstierhaltung	Scionics Computer Innovation GmbH, Löscherstraße 16, D- 01309 Dresden	Version 4.5.1 – 561
Ringleuchte Medow 960 Pro Bi Color	Walimex Pro, Im Kazenloch 55 D-75446 Wiernsheim	Seriennummer: 22043
Spatel / Pinzette	Fine Science Tools (FST) GmbH, Vangerowstraße 14, D-69115 Heidelberg	
Speicherkarte	SanDisk, Western Digital UK Limited, Connaught House, 255 High Street Guildford, England	256 GB
Stativ	Manfrotto, Cassola Norditalien	MK055XPRO3-3W inklusive 3-Wege- Neiger
Sterican Standardkanüle	Becton Dickinson GmbH, S. A. Fraga Spanien	Einmalkanüle mit Präzisionsfacettenschliff, Artikelnummer 301300, 20 G x 1 1/2 (Gr. 1), Ø 0,90 x 40 mm, gelb

Produkt	Hersteller	Sonstiges
Target Stick mit nasenfreundlicher Kugel und Klicker	TRIXIE Heimtierbedarf GmbH & Co. KG, Industrierstraße 32, D-24963 Tarp	Artikelnummer 2282, Maße: 14 cm, ausziehbar von 14 - 65 cm
Thermometer	VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, D-64295 Darmstadt	VWR® Traceable, Wasserdicht und stoßfest, Bestellnummer 620-2017
Weißer Schokolade Creme	Brinkers Food B.V., Enschede, Niederland	Zutaten: Zucker, Rapsöl, Magermilchpulver , Süßmolkepulver , Kakaobutter, Laktose , weiße Schokolade 2,5 % (Zucker, Kakaobutter, Vollmilchpulver), wasserfreies Milchfett , Emulgator: Sojalecithine , Antioxidationsmittel: stark tocopherolhaltige Extrakte, Aromen.
XNote Stopwatch	Dmitry Nikitin	Version 1.60, Erscheinungsdatum 02.03.2018
Zylinder	VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, D-64295 Darmstadt	2000 ml

3.1 ETISCHE STELLUNGNAHME

Alle Tierversuchsvorhaben sind vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz gemäß der Richtlinie 2010/63/EU (Europäische Parlament and Union, 2010) des Europäischen Parlaments zum Schutz der für den wissenschaftlichen Zweck verwendeten Tiere genehmigt (Aktenzeichen, G20 - 1 - 131). Des Weiteren wurden die Versuche nur unter den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) sowie der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) durchgeführt.

3.2 VERSUCHSTIERE, HALTUNG UND HANDHABUNG

Alle Mäuse wurden nach den Empfehlungen der *Federation of Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) aufgezogen sowie unter Einhaltung des § 11 des Tierschutzgesetzes, gehalten. Die Einrichtung unterliegt einem Hygienekonzept, welche die Testung auf mikrobiologische Keime, Viren und Parasiten zweimal im Jahr auf der Grundlage der „FELASA recommendations“ durchführt (Mähler Convenor et al., 2014). Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in Gruppen von zwei bis drei Tieren (gleichgeschlechtlich) in lange Typ II Käfige mit Filterdeckel untergebracht. Diese wurden mit grauen, opaken, 10 cm langen PVC-Röhren, zwei Tüchern und einem rot-transparenten Unterschlupf ausgestattet. Die Tiere wurden in einem 12/12 - Hell - Dunkel - Zyklus (200 Lux von 7:00 bis 19:00 Uhr) in einem temperatur - und feuchtigkeitskontrollierten Raum (22 - 24° C bzw. 50 – 64 %) gehalten. Wasser und Futter (sniff Spezialdiäten, Maus - Zucht - Pellets) wurden *ad libitum* angeboten.

J. Hurst konnte mit ihren Untersuchungen nachweisen, dass die Tiere durch die Handhabung am Schwanz signifikant mehr Angst-assoziierte Verhaltensweisen zeigen, wie die Tiere, die entweder mit der Hand (Hand Cupping) oder mit einem Hilfsmittel, wie dem Tunnel umgesetzt wurden (Hurst and West, 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse werden unsere Tiere während des gesamten Versuches nur mit tierfreundlichen Handhabungsmethoden (der Hand oder dem Tunnel) umgesetzt bzw. gehandhabt (Abbildung 9).

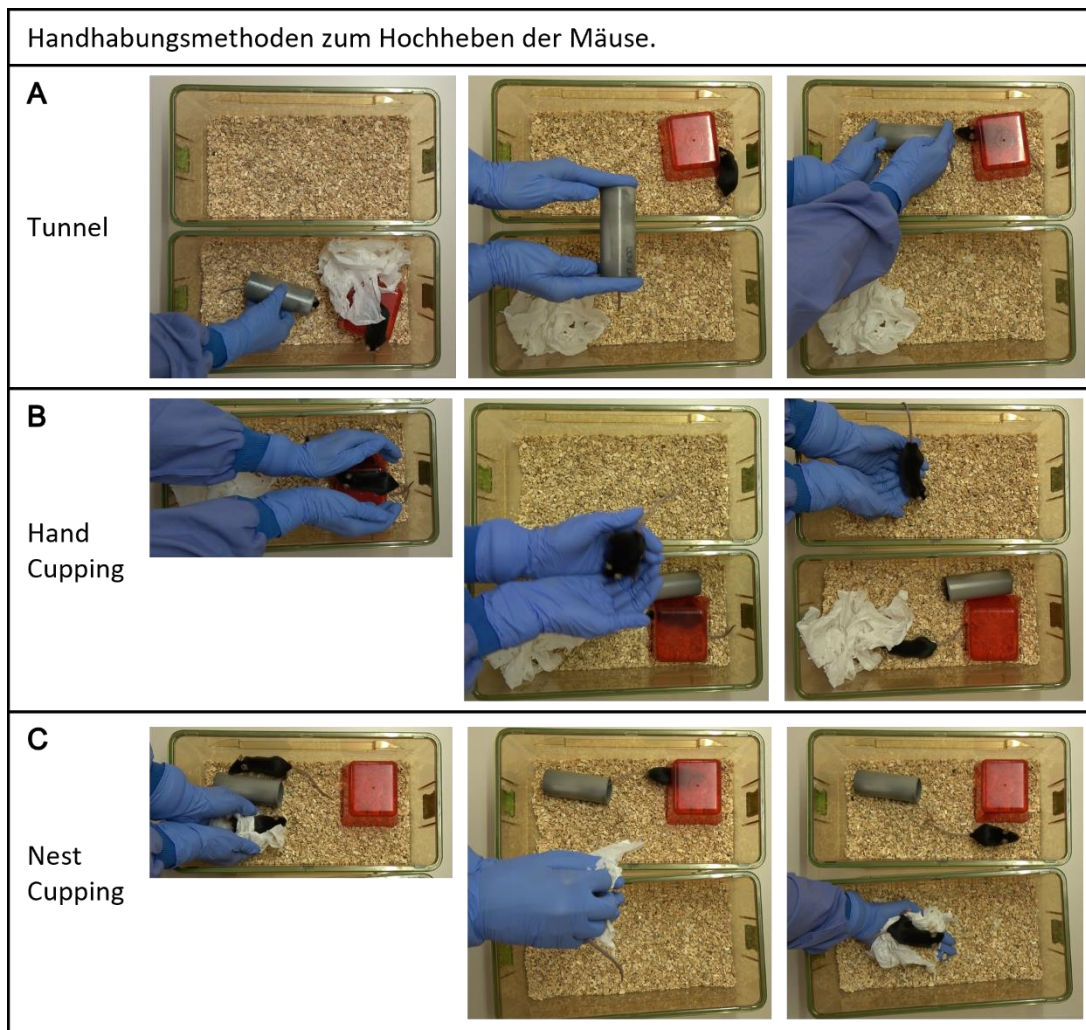


Abbildung 9: Handhabungsmethoden zum Hochhebe der Mäuse. Die Methode, welche sich am feinfühligsten für das Tier ist, ist die Handhabung mit dem Tunnel (**A**). Hierbei wird gewartet, bis das Tier freiwillig in den Tunnel läuft. Sobald das Tier im Tunnel sitzt, verschließen beide Hände die Öffnung und der Tunnel wird in den neuen Käfig gelegt. Nach einer Habituation können die Tiere auch mit der Hand (Hand Cupping) umgesetzt werden (**B**). Dabei umschließt die Hand das Tier und wird in den neuen Käfig gesetzt. Sehr ängstliche Tiere werden oft mit dem gesamten Nest (Nest Cupping) umgesetzt (**C**). Dabei umschließen beide Hände das Tier. Bildquelle: Sandra Reichel, 2024.

3.3 AUSZUCHTSTAMM CD - 1® IGS (CRL:CD1(ICR))

Für den Versuch wurden 24 Crl:CD1(ICR) Mäuse (sechs Wochen alte Weibchen) von einem verifizierten internationalen Züchter (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) erworben. Nach dem Klickertraining wurde diese mit einem Männchen des gleichen Stammes für sieben Tage verpaart. Damit es zu keinen überzähligen Tieren kommt, wurden alle Tiere aus der Zucht für die weiterführenden Versuche verwendet. Insgesamt wurden 105 weibliche und 111 männliche Nachkommen (F1) des Stammes Crl:CD1(ICR) verwendet.

3.4 INZUCHTSTAMM C57BL/6JRj

Für den Versuch wurden 14 C57BL/6JRj Mäuse (sechs Wochen alte Weibchen) von einem verifizierten internationalen Züchter (Janvier Labs, Le Genest – Saint - Isle, Frankreich) erworben. Nach dem Klickertraining wurde diese mit einem Männchen des gleichen Stammes für sieben Tage verpaart. Damit es zu keinen überzähligen Tieren kommt, wurden alle Tiere aus der Zucht für die weiterführenden Versuche verwendet. Insgesamt wurden 17 weibliche und 21 männliche Nachkommen (F1) des Stammes C57BL/6JRj verwendet.

3.5 VERSUCHSABLAUF DER MÜTTER: PROTOKOLL A UND B

Am Tag der Ankunft wurden die Tiere mittels Ohrstanzen markiert und in die jeweiligen Gruppen eingeteilt. Die Tier-IDs wurden über eine Software für Versuchstierhaltung (PyRAT) automatisch generiert und zugeteilt. Nach der Markierung und der dafür notwendigen einmaligen Fixierung, hatten die Tiere eine Eingewöhnungszeit von fünf Tagen, bevor mit dem Klickertraining begonnen wurde. Der Trainingsablauf (Abbildung 10) begann mit dem ersten Tag, an dem der Test auf Interaktion (Tal) durchgeführt wurde und die Gewichtsmessung (KGW) stattfand. Nach der Messung kamen die Tiere in saubere Käfige. Innerhalb der nächsten zwei Tage fand die Präsentation der Belohnung statt. Im Anschluss darauf folgte die erste Trainingseinheit (Tag 4). In den darauffolgenden drei Tagen wurde das Klickertraining täglich wiederholt (Tabelle 4). Nach dem Klickertraining, an Tag 8, wurde der Test auf Interaktion und die Gewichtsmessung wiederholt. Anschließend wurden die weiblichen mit den männlichen Tieren verpaart. Nach 7 Tagen wurden die Tiere wieder getrennt. Ab dem 21. Tag wurde mit der Geburt der Nachkommen gerechnet. In Protokoll A (Abbildung 10) wurden die Nachkommen bis zu einem Alter von drei Wochen bei den Müttern gelassen und dann abgesetzt (P21). Die Ohrmarkierung, sowie die Zuweisung der IDs erfolgten noch am selben Tag. Das Klickertraining der Nachkommen begann im Alter von 7 Wochen. In Protokoll B (Abbildung 10) wurden die Mütter ein zweites Mal trainiert. Das Klickertraining wurde wiederholt sobald die Nachkommen 14 Tage alt waren (P14). Der Test auf Interaktion sowie die Gewichtsmessung wurden an Tag 44 durchgeführt. Danach fand keine Belohnungspräsentation sowie die Klickereinführung statt, da die Tiere sowohl den Klick als auch die Belohnung bereits kannten. Das Klickertraining begann sofort mit der ersten Trainingsphase. In den darauffolgenden drei Tagen wurde das Klickertraining täglich wiederholt (Tabelle 4). Nach dem Klickertraining, wurde der Test auf Interaktion und die Gewichtsmessung wiederholt.

Protokoll A

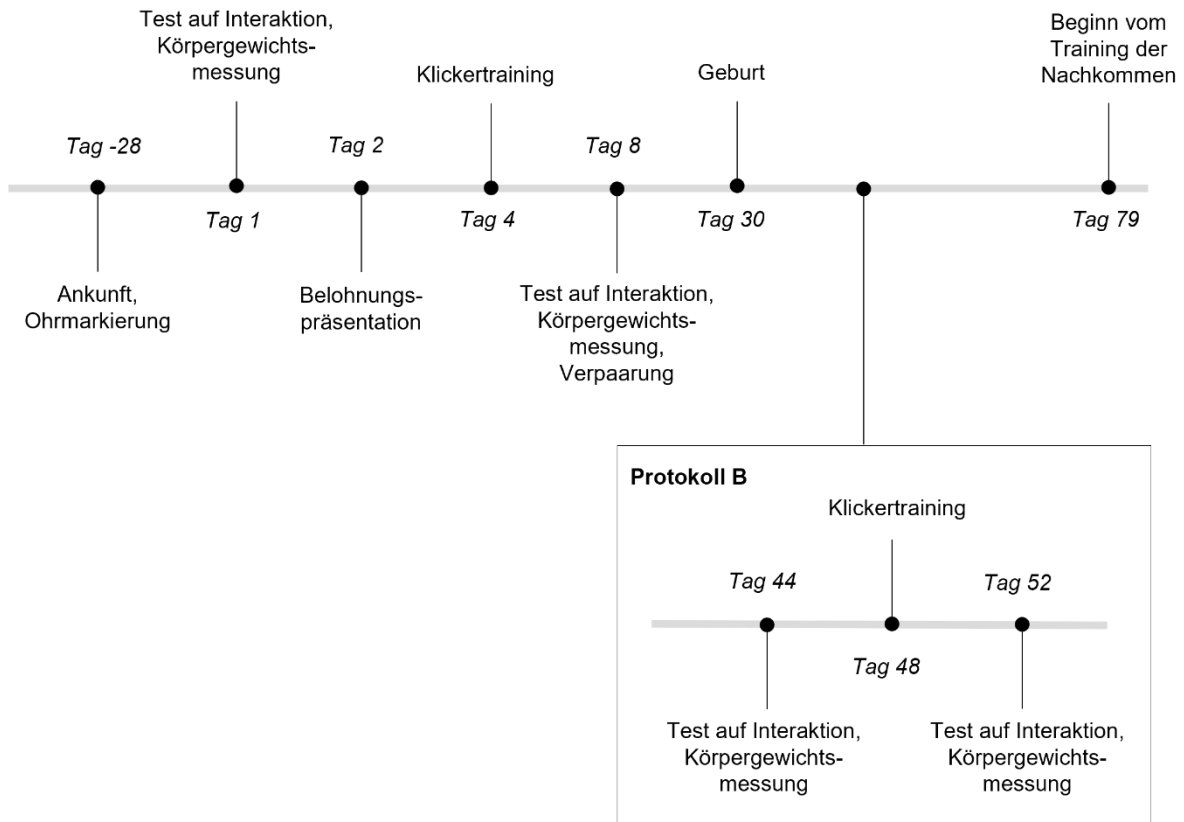
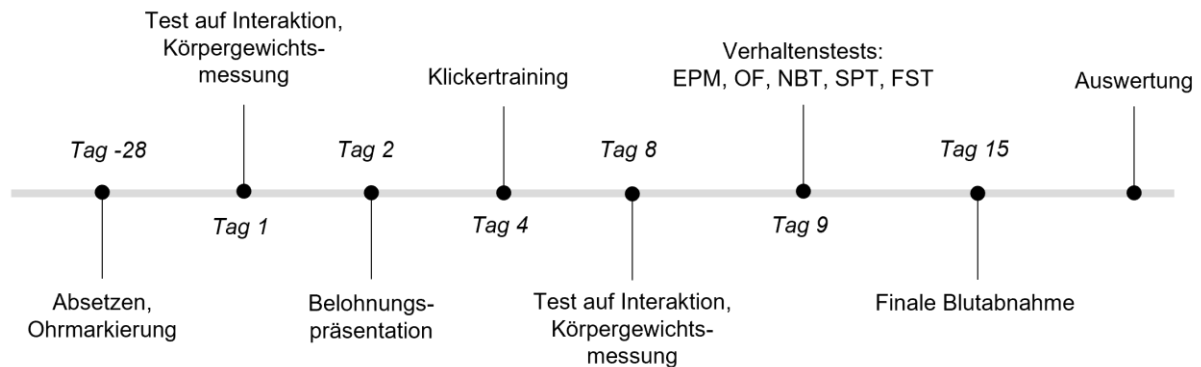


Abbildung 10: Allgemeiner Versuchsablauf der Mütter. In Protokoll A werden die Mütter nur einmal trainiert. In Protokoll B werden die Mütter 14 Tage nach Geburt noch einmal trainiert.

3.6 VERSUCHSABLAUF DER NACHKOMMEN

Mit einem Alter von drei Wochen wurden die Nachkommen abgesetzt und mittels Ohrstanzen markiert. Die Tier-IDs wurden über die Software für Versuchstierhaltung (PyRAT) automatisch generiert und zugeteilt. Nach der Markierung und der dafür notwendigen einmaligen Fixierung, hatten die Tiere eine Eingewöhnungszeit von vier Wochen. Mit dem Klickertraining der Nachkommen wurde im Alter von 7 Wochen begonnen. Der Trainingsablauf (Abbildung 10) begann mit dem ersten Tag, dem Test auf Interaktion (TaI) und der Gewichtsmessung (KGW). Nach der Messung kamen die Tiere in saubere Käfige. Innerhalb der nächsten zwei Tage fand die Präsentation der Belohnung statt. Im Anschluss darauf folgte die erste Trainingseinheit (Tag 4). In den darauffolgenden drei Tagen wurde das Klickertraining täglich wiederholt (Tabelle 4). Nach dem Klickertraining (Tag 8) wurde der Test auf Interaktion und die Gewichtsmessung wiederholt. Ab Tag 9 starteten die Verhaltenstests (EPM, OF, NBT, SPT, FST), die mit einer abschließenden Blutentnahme an Tag 15 abgeschlossen wurden. Danach

erfolgte die Auswertung der gewonnenen Daten. Die detaillierten Informationen zu den einzelnen Abläufen und Durchführungen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.



Verhaltenstests:

EPM	= Erhöhtes Plus Labyrinth	OF	= Offener Feld Test	NBT	= Nestbautest
SPT	= Saccharose Präferenz Test	FST	= erzwungener Schwimmtest		

Abbildung 11: Allgemeiner Versuchsablauf der F1 Generation (Nachkommen) mit den Verhaltenstests.

3.7 TEST AUF INTERAKTION

Der Test auf Interaktion ist ein Verhaltenstest, welcher die freiwillige Interaktion zwischen Tier und Experimentator zeitlich bewertet (Hurst and West, 2010). Der Test wurde vor (Tag 1) und nach dem Klickertraining (Tag 8) durchgeführt. Hierzu verblieben die Mäuse in ihrer Gruppe, d. h. der Test erfolgte pro Käfig (2 - 3 Tiere pro Käfig). Bevor mit der Videoaufzeichnung begonnen wurde, wurden der Käfigdeckel, das Gitter, der Tunnel, der Unterschlupf und das Nestmaterial entfernt. Zusätzlich musste eine erneute Kennzeichnung der Tiere erfolgen, damit diese im Video sichtbar ist. Dafür hat sich eine farbliche Markierung am Schwanz mit einem Edding Marker bewährt. Die Aufzeichnungen erfolgten bei Raumlicht. Das Video wurde gestartet, sobald der Experimentator ruhig und direkt vor dem Käfig stand (Abbildung 12, A). Dies dauerte 60 Sekunden. In den darauffolgenden 60 Sekunden wurde eine Hand (mit Handschuh) in den vorderen Teil der Käfigschale auf die Einstreu gelegt und abgewartet (Abbildung 12, B - E). Nach dem Test wurde das Körpergewicht ermittelt und die Tiere wurden in einen sauberen Käfig gesetzt. Die Auswertung der Videodaten erfolgte manuell mit einem Computerprogramm (XNote Stopwatch). Es wurden folgende Parameter gemessen: die Zeit, die die Maus damit verbringt an der Hand zu riechen (Abbildung 12, C), diese berührt (Abbildung 12, D) und darauf klettert (Abbildung 12, E).

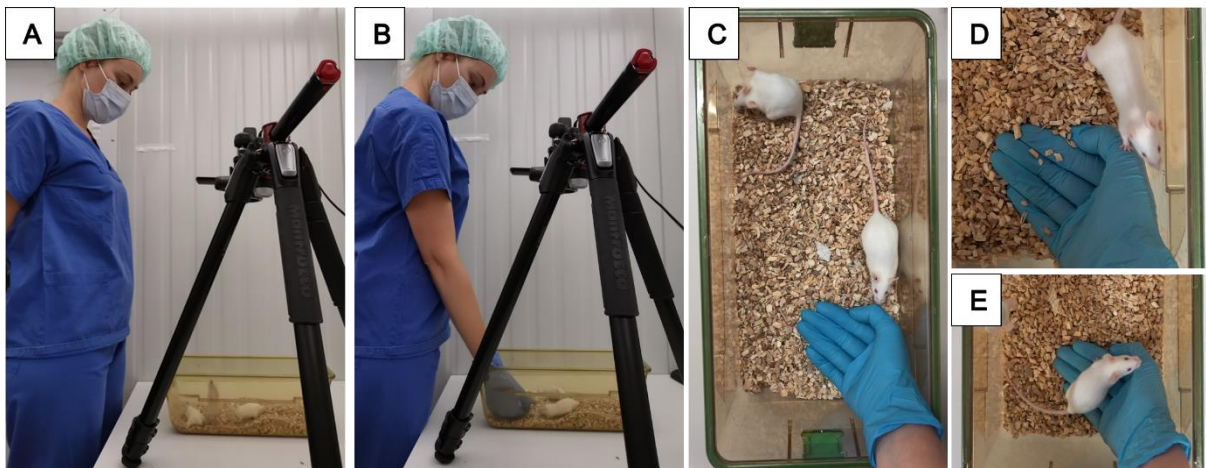


Abbildung 12: Durchführung des Tests auf Interaktion und dessen Auswertung. Die ersten 60 Sekunden ohne Hand (A) und die darauffolgenden 60 Sekunden mit Hand (B). Die Bilder C - E zeigen die Parameter zum Auswerten: riechen (C), berühren (D) und auf die Hand klettern (E). Bildquelle: Sandra Reichel, (A/B) 2021/(C-E) 2024.

3.8 KÖRPERGEWICHTSMESSUNG (KGW)

Das Körpergewicht wurde zweimal, jeweils immer nach dem Test auf Interaktion, ermittelt (Abbildung 10, Abbildung 11). Die Maus wurde unter Verwendung einer tierfreundlichen Methode in einem Behältnis (eine Schüssel) platziert, um sie auf die Waage zu setzen. Die Schüssel wurde nach jedem Käfig mit 70 % Ethanol gereinigt. Bevor die nächste Maus in die Schale gesetzt wurde, wurde gewartet, bis das Ethanol verdampft war.

3.9 PRÄSENTATION DER BELOHNUNG (PRIMÄR VERSTÄRKER)

Die Belohnung, welche den bestmöglichen Erfolg im Klickertraining bringt, wurde zuvor ermittelt (Leidinger et al., 2017). Für das Klickertraining wurde die weiße Schokoladencreme von Brinkers (Abbildung 13) verwendet. Mit dieser zeigten die Tiere die längste Motivation um sich am Training zu beteiligen und sie war leicht zu dosieren. Feste Nahrung wie z. B. Blockschokolade wurde ebenfalls gut von den Tieren angenommen. Jedoch wurde immer ein kleines Stück abgebrochen, welches dann erst aufgegessen wird. Somit waren die Tiere nicht mehr aktiv an dem Klickertraining interessiert und die Motivation nahm schnell ab. Da die weiße Schokoladencreme bisher noch unbekannt war, wurde diese den Tieren zuvor erst einmal angeboten. Ansonsten war ein Klickertraining nur schwer möglich. Die Präsentation der weißen Schokoladencreme fand an zwei Tagen statt. Die Schokoladencreme wurde an zwei verschiedene Stellen an die Käfigwand geschmiert, damit jedes Tier die Möglichkeit hatte, sie zu erreichen. Aufgrund der Rangordnung konnte es dazu kommen, dass nur das ranghöchste

Tier die Schokolade für sich beansprucht. Die Menge der Schokoladencreme entsprach etwa zwei Spateln. Die exakte Gewichtsmenge war nicht relevant, sie sollte jedoch ungefähr gleich sein. Die Präsentation der Belohnung begann am späten Nachmittag, dann wenn die Tiere aktiver wurden. So konnte der Käfig geöffnet und die Belohnung platziert werden, ohne die Tiere zu wecken. Nach den zwei Tagen konnte mit dem ersten Teil des Klickertrainings, der Einführung, begonnen werden.

3.10 EINFÜHRUNG DES KLICKS (SEKUNDÄRER VERSTÄRKER)

Bevor mit dem Klickertraining begonnen wurde, musste eine Verbindung zwischen dem Sekundären, dem Klick, und dem primären Verstärker, der Belohnung, hergestellt werden (Abbildung 13).

A Weiße Schokoladencreme

(Primärer Verstärker)



(Quelle: Amazon)

B Klicker mit Target Stick

(Sekundärer Verstärker)



(Quelle: Zooplus)

Abbildung 13: Die weiße Schokoladencreme (primärer Verstärker) von Brinkers (A) und der Klicker mit Target Stick (sekundärer Verstärker) von Trixi (B), welche für das Klickertraining genutzt werden. (Amazon, Zooplus)

Nach der Präsentation der Belohnung wurde mit der Einführung des sekundären Verstärkers, dem Klick, begonnen. Hierzu wurden zwei Varianten getestet. In der ersten Variante betrug die Einführung 10 Minuten. In der zweiten Variante war diese verkürzt und betrug 5 Minuten. Es wurde untersucht, ob eine verkürzte Einführung von 5 Minuten den gleichen Erfolg bringt, wie eine doppelt so lange Einführung. Dies hätte eine enorme Zeiteinsparung für den Wissenschaftler zur Folge und eine geringere Variation in der Zeit zwischen den einzelnen Versuchstieren. Bei der 10-minütigen Einführung ist die maximale Anzahl an Tieren auf 24 Tiere pro Tag begrenzt. Wie im letzten Absatz erläutert, lag der Unterschied der Varianten nur im zeitlichen Aspekt, jedoch nicht in der Durchführung. Daher gilt die nachfolgende Beschreibung für beide Varianten.

Zur Vorbereitung wurden folgende Materialien benötigt: einen sauberen Wartekäfig, einen Klicker, die weiße Schokoladencreme als Belohnung, einen Spatel um die Belohnung zu applizieren, eine Stoppuhr, einen Notizzettel und den Tunnel aus dem Heimatkäfig (Abbildung 14).



Abbildung 14: Materialien für das Klickertraining. Von links: Heimatkäfig mit Tunnel, Wartekäfig mit Unterschlupf und Nestmaterial, Belohnung (weiße Schokoladencreme), Laborbuch für Notizen, Intervallstoppuhr, Klicker mit Target-Stick und Spatel. Bildquelle: Sandra Reichel, 2024.

Die Tiere wurden in einem ruhigen Raum ohne Störung trainiert. Dazu wurden sie min. 30 Minuten vor Trainingsbeginn in einen separaten Raum transportiert. Anschließend wurden die Vorbereitungen getroffen und die Utensilien beschafft. Die Tiere, die nicht trainiert wurden, verblieben im Haltungsraum und bekamen nur etwas von der Belohnung an die Käfigwand geschmiert. So konnte der Einfluss der Belohnung ausgeschlossen werden. Jede Maus wurde einzeln trainiert. Dafür wurde sich eine Maus für das Klickertraining ausgesucht wohingegen die anderen Mäuse in einen sauberen Käfig zum Warten überführt wurden. Nicht nur die Tiere, sondern auch die Materialien, wie das Gitter, die Tücher und der Unterschlupf, wurden im Wartekäfig platziert. Der Tunnel verblieb im Heimatkäfig, da dieser für das Klickertraining benötigt wurde. Der Wartekäfig mit den Tieren wurde vor die Tür des Raumes gestellt. Dies hatte den Vorteil, dass die Tiere, welche noch auf das Training warteten, nicht von dem Klick ohne Belohnung abgelenkt wurden bzw. dass der sekundäre Verstärker ein unerwünschtes Verhalten verursachte. Nach Abschluss der Vorbereitungen und nachdem die Mäuse in den Wartekäfig gesetzt wurden, wurde mit der Einführung begonnen.

Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf der Einführung des sekundären Verstärkers

Akklimatisation	Einführung des sekundären Verstärkers	Akklimatisation	Klickertraining
30 Sekunden	5/10 Minuten	30 Sekunden	3 Minuten

In dem Heimatkäfig befanden sich nun nur noch die zu trainierende Maus und der Tunnel. Anschließend wurde der Spatel mit der Belohnung vorbereitet. In der linken Hand befand sich der Klicker und in der rechten der Spatel mit der Belohnung. Der Deckel sowie der Tunnel wurden entfernt und die Stoppuhr wurde gestartet. Sobald die ersten 30 Sekunden (Akklimatisationszeit) vorbei waren, wurde der Tunnel an den Rand des Käfigs wieder hineingelegt. In den nächsten 10 Minuten hatte die Maus nun die Möglichkeit freiwillig in den Tunnel zu laufen. Sobald sie dieses Verhalten gezeigt hatte, wurde geklickt und die Belohnung wurde am Ende vom Tunnel präsentiert (Abbildung 15). Sobald die Maus angefangen hatte zu fressen, wurde konstant für weitere 10-mal geklickt.

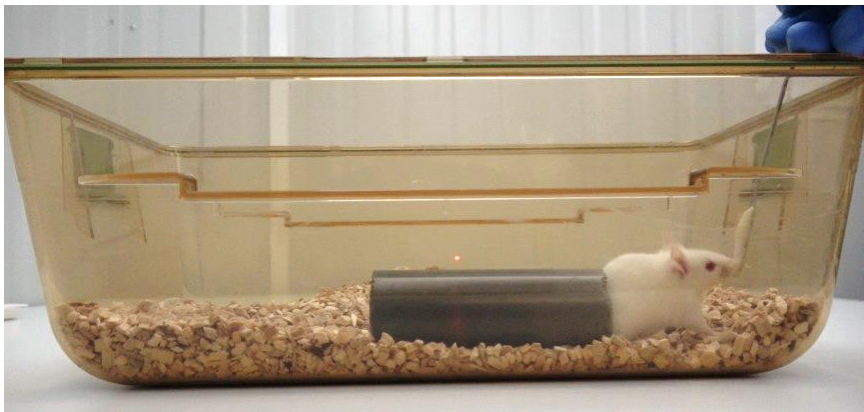


Abbildung 15: Klickereinführung mit dem CD1 Stamm. Die Maus sitzt neben dem Tunnel, währenddessen wird geklickt und die Belohnung präsentiert. Bildquelle: Sandra Reichel, 2023.

Hatte die Maus ohne Unterbrechung gefressen, galt die Einführung als erfolgreich. Hörte die Maus jedoch auf zu fressen, bevor die 10 Klicks geschafft wurden, galt die Einführung als nicht erfolgreich. Der Spatel mit der Belohnung wurde entfernt und es wurde gewartet, bis die Maus aus dem Tunnel lief. Sobald die Maus wieder in den Tunnel hineinlief, wurde der Ablauf wiederholt und zwar so lange bis die 5 bzw. 10 Minuten vorbei waren. In Einzelfällen kam es dazu, dass die Maus das gewünschte Trainingsverhalten mehr als nur einmal gezeigt hatte. Daraufhin wurde die Einführung abgebrochen und galt als erfolgreich. Da die Einführung zu Trainingsbeginn erfolgte, wurde direkt im Anschluss, die erste Trainingseinheit absolviert. Nach den 5/10 Minuten wurde der Tunnel für weitere 30 Sekunden (Akklimatisationszeit)

wieder aus dem Käfig genommen. Somit gab es eine Veränderung für die Maus, welche das Ende der Einführung bestätigte und das eigentliche Klickertraining konnte begonnen werden.

3.11 ABLAUF UND DURCHFÜHRUNG DES KLICKERTRAININGS

In diesem Teilabschnitt wird näher auf den Ablauf und die Durchführung des Klickertrainings eingegangen. Die Grundlage des Klickertrainings basiert auf der Publikation von Leidinger (Leidinger et al., 2017).

Tabelle 4: Zusammenfassung des Klickertrainings ab dem vierten Tag.

Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag
Einführung & Training (1. Tag)	Training (2. Tag)	Training (3. Tag)	Training (4. Tag)

Das Klickertraining fand von Montag bis Donnerstag statt (Tabelle 4). Insgesamt wurden vier Tage trainiert. Der Ablauf war an allen Tagen gleich. Wie im letzten Absatz erläutert, verblieb die zu trainierende Maus einzeln im Heimatkäfig, während die anderen in dem Wartekäfig vor dem Trainingsraum warteten. Das ganze Material im Käfig, bis auf den Tunnel, wurde ebenfalls in den Wartekäfig überführt. Alle Utensilien wurden nun bereitgestellt und die Stoppuhr wurde vorbereitet. Am besten eignete sich eine Intervallstoppuhr (App) für das Mobilgerät (Abbildung 16).



Abbildung 16: Ablauf vom Klickertraining auf der Intervallstoppuhr. Es begann mit der Vorbereitung (Akklimatisation) ohne Tunnel, gefolgt von drei Trainingseinheiten zu je 45 Sekunden mit Tunnel und anschließender 15 Sekunden langer Pause in dem der Tunnel wieder aus dem Käfig genommen wurde. Bildquelle: Sandra Reichel, 2024.

Die erste Phase war die Akklimation, welche 30 Sekunden dauert. In dieser wurde der Tunnel entfernt und die Maus hatte Gelegenheit, sich an die Veränderung im Käfig zu gewöhnen. Sobald diese vergangen waren, begann direkt die erste Trainingseinheit. Hierzu wurde der Tunnel an die Wand in den Käfig zurückgelegt. Der Ablauf war der Gleiche wie bei der Einführung. Sobald die Maus in den Tunnel lief, wurde geklickt und am Ende vom Tunnel bekam sie die Belohnung angeboten. Der Unterschied zur Einführung bestand nun darin, dass die Belohnung nicht mehr konstant präsentiert wurde, sondern nur noch 1 Sekunde lang. Somit war es der Maus nur einmal möglich, daran zu lecken. Dies wurde 45 Sekunden lang fortgeführt. In der darauffolgenden 15 Sekunden langen Pause wurde der Tunnel entfernt und die Anzahl des erfolgreichen Verhaltens notiert. Zur zweiten Trainingsphase wurde der Tunnel wieder an die gleiche Stelle im Käfig zurückgelegt. Insgesamt wurde die Trainingseinheit dreimal wiederholt. Die gesamte Trainingszeit betrug somit 3 Minuten und 30 Sekunden pro Tier pro Tag. Anschließend wurde das trainierte Tier in den Wartekäfig gesetzt und gegen ein neu zu trainierendes Tier ausgetauscht.

3.12 VERHALTENSTEST

Aufbauend auf dem Klickertraining, soll im Folgenden die Durchführung der Verhaltenstest näher beschrieben werden.

Tabelle 5: Zeitliche Abfolge der Verhaltenstests.

Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14	Tag 15
EPM	OF	NBT	SPT	SPT	SPT	FST, Blut-entnahme

Der Schweregrad der Tests bestimmte die Reihenfolge. Es wurde mit dem am wenigsten belastenden Test begonnen. Der EPM, OF, NBT und SPT werden mit einer geringen Belastung eingestuft. Der FST hingegen wird mit einer mittelgradigen Belastung eingestuft und daher erfolgte dieser am Ende der Verhaltenstestreihe. 15 Minuten nach dem FST wurden die Mäuse euthanasiert und das Herz punktiert, wodurch das Blut für die weiteren Analysen entnommen werden konnte.

3.12.1 ELEVATED PLUS MAZE TEST

Der Elevated Plus Maze Test liefert Ergebnisse über die Angst-assoziierten Verhaltensweisen der Mäuse. Die Tiere, welche Angst-assoziierte Verhaltensweisen zeigen, werden sich

bevorzugt in den geschlossenen Armen aufhalten. Die Tiere wurden aus dem Haltungsraum in den Experimentalraum transportiert, wo sie 30 Minuten lang Zeit hatten, sich zu akklimatisieren. Währenddessen konnten die Vorbereitungen getroffen werden. Der Aufbau erfolgte wie in Abbildung 17 (B) dargestellt.

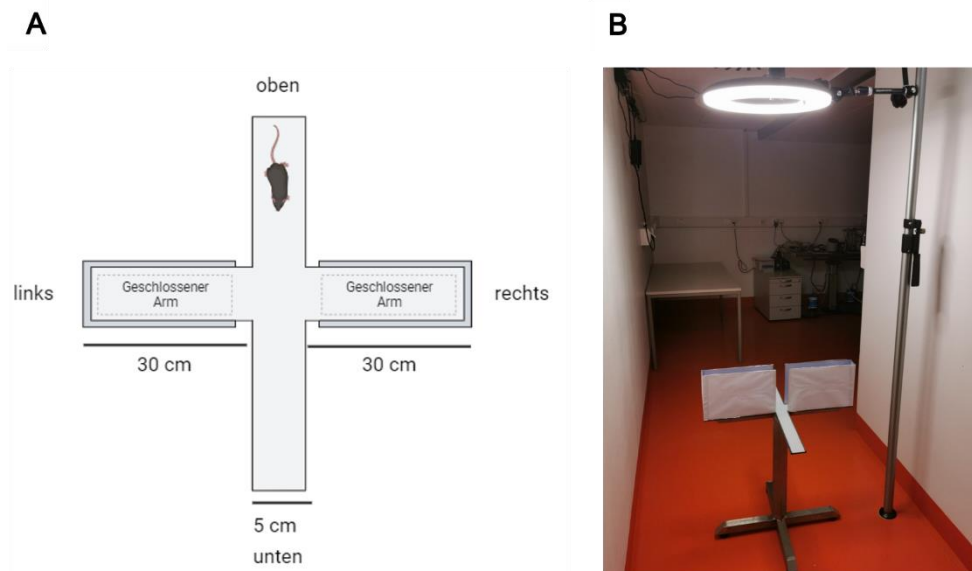


Abbildung 17: Aufbau des Elevated Plus Maze Test. Grafische Darstellung des EPM: Links und rechts ist der Arm geschlossen, oben und unten ist der Arm offen. Jeder Arm ist 30 cm lang (A), (Erstellt mit BioRender.com). Das EPM steht auf einer 62 cm hohen Plattform (B). Bildquelle: Sandra Reichel, 2022.

Die Kamera hing in einer senkrechten und mittigen Position über dem EPM. Diese wurde im Ringlicht in die dafür vorhergesehene Vorrichtung angebracht. Der Kamerazoom und die Lichtintensität (220 Lux) waren so eingestellt, dass keine Schatten im Video zu sehen waren (Abbildung 18). Diese waren ansonsten bei der nachfolgenden Auswertung hinderlich. Es war wichtig, dass das EPM mittig unter dem Ringlicht steht. Die Lichtintensität wurde mit einem Luxmeter gemessen. Dafür zeigte der Sensor nach oben. Mittels des EthoVision XT Programms von Noldus erfolgte später die Auswertung. Für diese Auswertung wurde eine zusätzliche kurze Aufzeichnung erforderlich. Anhand dieser Aufzeichnungen konnte eine Vorlage erstellt werden. Mittels dieser Vorlage konnte in der späteren Auswertung die Einstellungen wie z. B. Arena, bei EthoVision festgelegt werden. Der Untergrund musste einen guten Kontrast zur Fellfarbe aufweisen. Da verschiedene Mauslinien mit verschiedenen Fellfarben getestet wurden, wurde der Untergrund in der Farbe Grau gewählt. Somit gab es einen ausreichenden Kontrast für weiße als auch für schwarze Mäuse. Sobald alle Vorbereitungen getroffen wurden, wurde mit dem Test begonnen. Die Einstellungen und die Vorbereitungen konnten auch am Vortag stattfinden. Die Verhaltenstests fanden regelmäßig morgens um 9:00 Uhr statt. Das EPM wurde nach jeder Maus und vor der ersten Maus mit 70 % Ethanol gereinigt. Zur eindeutigen Identifizierung musste die Tier-IDs auf den Videos gut

lesbar sein. Das Video wurde gestartet und die Aufzeichnung begann. Die Maus wurde mittels Tunnel im offenen Arm entlassen. Der Tunnel sollte maximal 3 cm auf dem EPM (im offenen Arm) liegen. Eine Seite des Tunnels wurde mit der Hand zugehalten, so dass die Maus nur eine Möglichkeit hatte, den Tunnel zu verlassen (Abbildung 18).

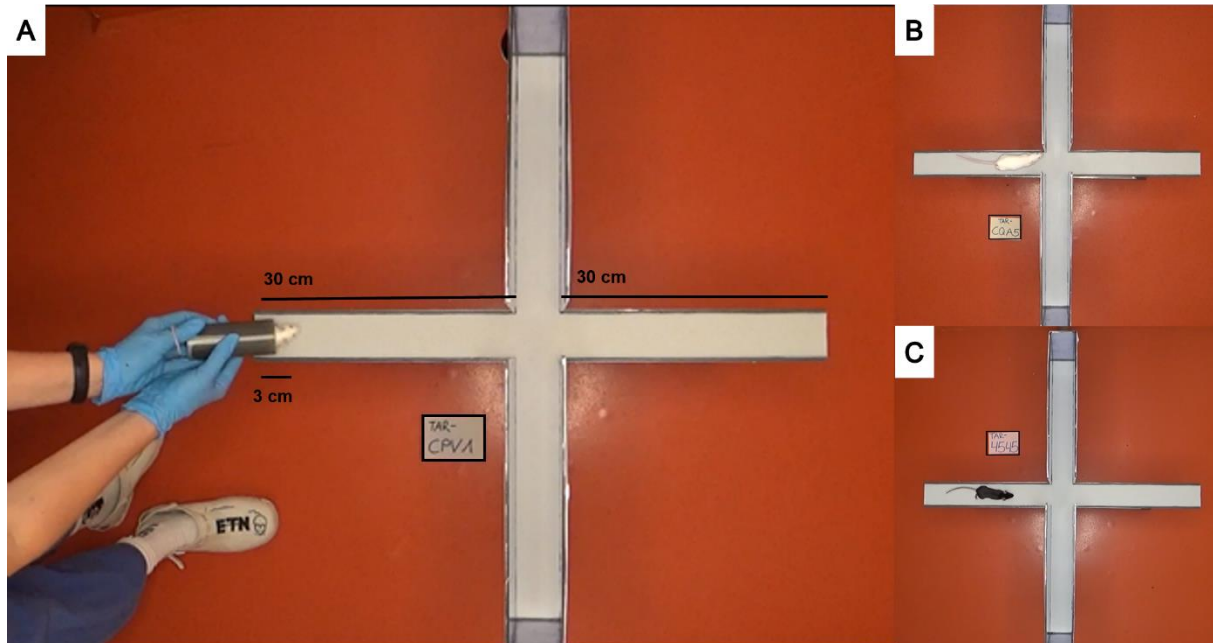


Abbildung 18: Positionierung der Kamera und Einstellung des Lichtes, sowie die Platzierung der Maus. Der Tunnel mit der Maus sollte waagrecht maximal 3 cm auf dem offenen Arm des EPM liegen (A). Die Tier-ID Karten sollten im Video gut lesbar sein. Der Hintergrund sollte einen guten Kontrast zur Maus aufweisen (B/C). Bildquelle: Sandra Reichel, 2024.

Es wurde gewartet, bis die Maus freiwillig aus dem Tunnel lief. Sobald die Maus diesen verlassen hatte, wurde die Stoppuhr gestartet und 5 Minuten abgewartet. Während der Aufnahme verweilte der Experimentator ruhig im Raum, aber nicht in Sichtweite der Maus. Nach Ablauf der 5 Minuten wurde die Aufzeichnung gestoppt. Der Tunnel wurde in die Arena hineingelegt und abgewartet, bis die Maus freiwillig in den Tunnel lief. Anschließend wurde sie mit dem Tunnel zurück in den Käfig gesetzt und mit einer anderen Maus fortgesetzt.

3.12.2 OPEN FIELD TEST

Dieser Abschnitt befasst sich mit dem Open Field Test, welcher ebenfalls Rückschlüsse auf die Angst-assoziierten Verhaltensweisen der Tiere zieht. Als Erstes wurden die Tiere aus dem Haltungsräum in den Experimentalraum transportiert, wo sie 30 Minuten Zeit hatten, sich zu akklimatisieren. Währenddessen wurden die Vorbereitungen getroffen. Die Apparatur wurde aufgebaut und die Einstellungen vorgenommen. Die Position der Videokamera war senkrecht

und mittig über der OF Box. Die Lichtintensität betrug 220 Lux und wurde so eingestellt, dass keine Schatten auf dem Video zu sehen waren (Abbildung 20). Dafür wurde der Luxmeter mit dem Sensor nach oben im OF platziert. Für die Auswertung war es unerlässlich, dass vorher eine Vorlage erstellt wurde. Ansonsten konnte später keine Aussage über den Aufenthalt der Maus getroffen werden, ob diese sich in der Peripherie (Wall Zone) oder im Zentrum (Center Zone) aufhielt. Dazu wurden vier quadratische Schablonen mit der Größe von 10 x 10 cm (Abbildung 19 (A)) zurechtgeschnitten. Die vier Quadrate wurden nun in den vier Ecken verteilt, und eine kurze Aufzeichnung wurde mithilfe einer Videokamera gestartet. Mit diesem kurzen Video konnten anhand des EthoVision XT Programms von Noldus rückwirkend die Zonen festgelegt werden wodurch die Auswertung erfolgte. Je nach Fellfarbe wurde der Untergrund farblich angepasst, so dass ein guter Kontrast entstand. Bei den weißen CD1 Mäusen wurde ein schwarzer Untergrund und bei den schwarzen C57BL/6JRj Mäusen ein weißer Untergrund verwendet (Abbildung 20).

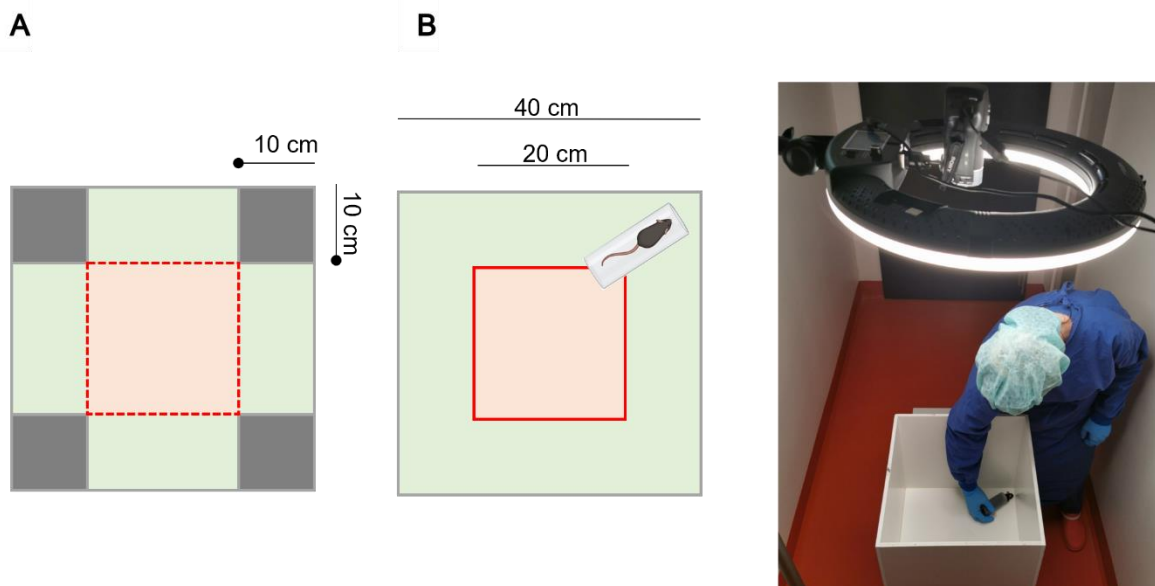


Abbildung 19: Aufbau Open Field Box. Die grauen Quadrate (10 x 10 cm) dienen als Schablonen, welche unerlässlich für die Bestimmung der Zonen mittels dem Programm EthoVision XT sind (A). Es gibt eine Peripherie (grün) und ein Zentrum (rot). Der Ausgangspunkt der Maus befindet sich immer in der selben Ecke der Peripherie (B). Maus im Tunnel wurde erstellt mit BioRender.com. Bildquelle: Sandra Reichel, 2022

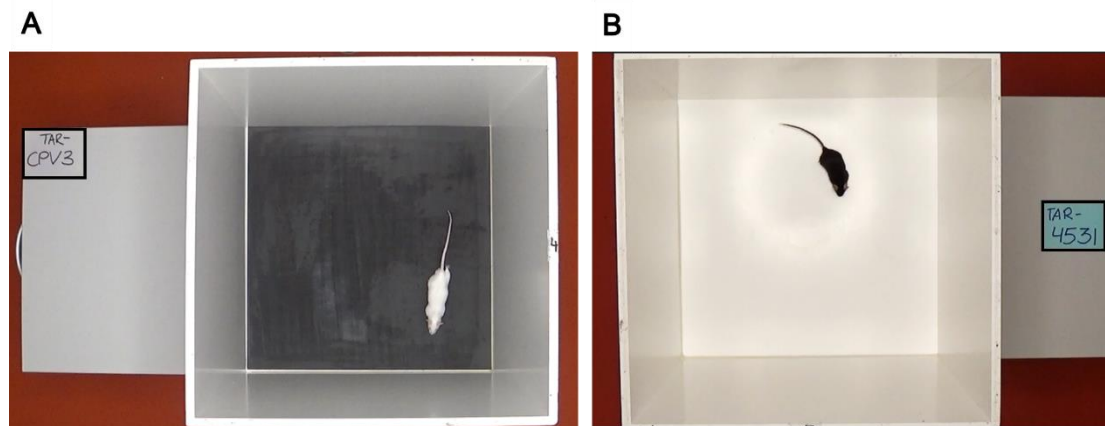


Abbildung 20: Anpassungen des Hintergrundes je nach Fellfarbe der Maus. Bei dem CD1 Stamm wurde ein schwarzer Hintergrund (A) gewählt, während bei dem C57BL/6JRj Stamm ein weißer Hintergrund (B) verwendet wurde. Bildquelle: Sandra Reichel, 2024.

Sobald alle Vorbereitungen getroffen wurden, begannen die Aufzeichnungen der Verhaltenstests. Die Testphase begann jeweils um 9:00 Uhr morgens. Die Box wurde vor der ersten Benutzung und nach jedem Gebrauch mit 70 % Ethanol gereinigt. Zur eindeutigen Identifizierung mussten die Tier-IDs auf den Videos gut lesbar sein. Das Video wurde gestartet und die Aufzeichnung begann. Die Maus wurde mittels Tunnel in die Ecke der OF Box hineingesetzt und so lange gewartet, bis diese den Tunnel freiwillig verließ. Sobald die Maus den Tunnel verlassen hatte, wurde dieser entfernt und die Stoppuhr gestartet. Die Maus hatte nun 5 Minuten Zeit, um die Box zu explorieren. Der Experimentator blieb weiterhin im Raum ruhig sitzen. Nach Ablauf der 5 Minuten wurde die Videoaufzeichnung gestoppt und der Versuch war beendet. Die Maus wurde wieder mit dem Tunnel herausgeholt. Dabei wurde darauf geachtet, dass auch hier die Maus freiwillig in den Tunnel hineinlief. Es konnte mit dem nächsten Tier fortgeführt werden.

3.12.3 NESTBAUTEST

Der Versuch fand in einem sauberen Typ II Käfig statt. Hierzu wurden die Tiere einzeln gesetzt. Die notwendigen Käfige wurden vorbereitet. Dies konnte am selben Tag oder am Vortag geschehen. Pro Käfig wurde ein Nestlet mit einem Gewicht von 2,48 g - 2,52 g hineingelegt (Abbildung 21, A - F).

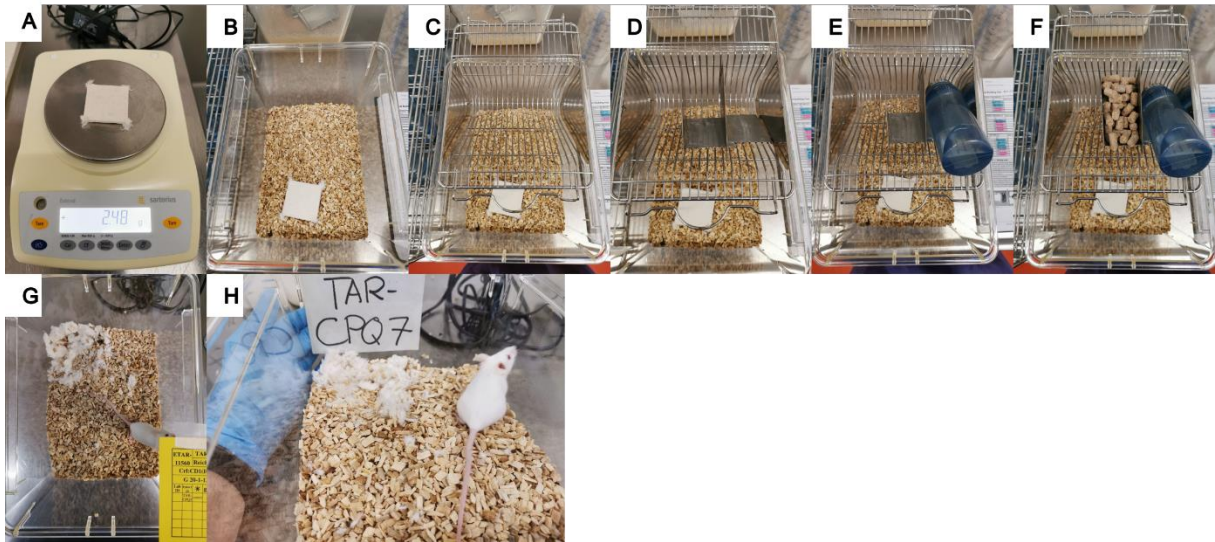


Abbildung 21: Vorbereitung (A - F) und Auswertung (G/H) des Nestbauverhaltens.
Bildquelle: Sandra Reichel, 2023.

Der erste Schritt bestand darin, das Gewicht des Nestlets zu bestimmen. Da diese nicht geeicht sind und stark variieren konnten, mussten diese zuvor durch die Entfernung eines Teilstückes angepasst werden. Im Käfig wurde nur ein Nestlet (Abbildung 21, B) aber keine weiteren Anreicherungen angeboten. Zur Vorbereitung auf den SPT wurden bereits jetzt zwei Trennbleche hinzugefügt (Abbildung 21, D). Anschließend kamen die Pellets, eine Flasche mit autoklaviertem Wasser (Abbildung 21, E/F) sowie die Maus hinzu. Die Auswertung (Deacon, 2006) erfolgte 12 Stunden später, am folgenden Morgen (Abbildung 21, G/H).

3.12.4 SACCHAROSE PRÄFERENZ TEST

Wie im letzten Abschnitt erläutert, wurden die Vorbereitungen für den Saccharose Präferenz Test (SPT) teilweise getroffen. Seit dem vorherigen Test (NBT) sitzen die Tiere in Einzelhaltung. Zusätzlich zu dem Nestlet kamen nun wieder ein Tunnel und zwei Papiertücher hinzu. Eine zweite Flasche mit einer 1 %igen Saccharoselösung wurde hinzugefügt (Abbildung 83/Abbildung 84/Abbildung 85). Diese war mit einem grünen Markierungspunkt versehen, so dass ein Vertauschen der Flaschen ausgeschlossen werden konnte.

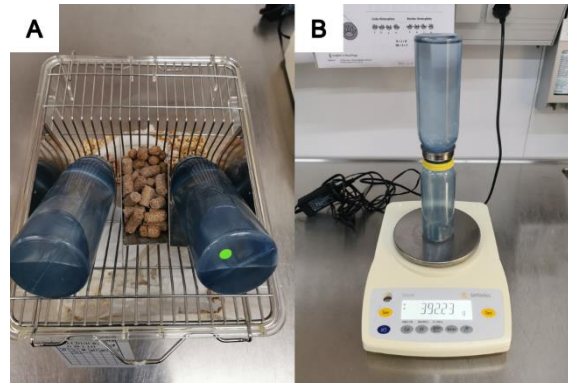


Abbildung 22: Aufbau des Saccharose Präferenztests. Eine zweite Flasche mit einer 1 %igen Saccharoselösung (grüner Markierungspunkt) wird dem Käfig hinzugefügt (**A**). Um das Gewicht der Lösung zu bestimmen, haben wir diese umgekehrt auf eine weitere, leere Flasche gestellt (**B**). Bildquelle: Sandra Reichel, 2022.

Der Test dauerte drei Tage. An den ersten beiden Tagen fand die Habituation statt. Hier konnten sich die Tiere an die zweite Flasche im Käfig, sowie an die Saccharoselösung gewöhnen. Damit die Tiere keine Seitenpräferenz entwickelten, wurden die Flaschen getauscht.

- Tag 1/Habituation (18:00 Uhr): Die Tiere befanden sich in Einzelhaltung mit zwei Flaschen pro Käfig, eine mit Saccharose (rechts) und eine mit Wasser (links).
- Tag 2/Habituation (6:00 Uhr): Es fand eine Vertauschung der Position der Flaschen statt. Saccharoselösung (links) und Wasser (rechts).
- Tag 2/Start der Messung (18:00 Uhr): Es fand eine erneute Vertauschung der Position der Flaschen statt. Saccharoselösung (rechts) und Wasser (links). Nun waren sie wieder auf Ausgangsposition.

An Tag zwei, nach dem letzten Tausch, wurden die Flaschen gewogen und die Messung begann. Die Flaschen wurden verkehrt herum gewogen (Startwert), um ein Tropfen und somit eine Verfälschung zu vermeiden (Abbildung 22, B). Nach 12 Stunden war der Versuch beendet und die Flaschen wurden erneut gewogen (Endwert), dafür wurde diese verkehrt herum platziert.

3.12.5 ERZWUNGENER SCHWIMMTEST

Im folgenden Abschnitt wird die Durchführung des erzwungenen Schwimmtests (*engl. Forced Swim Test*) beschrieben. In Abbildung 23 sind der Aufbau und die Materialien gezeigt.

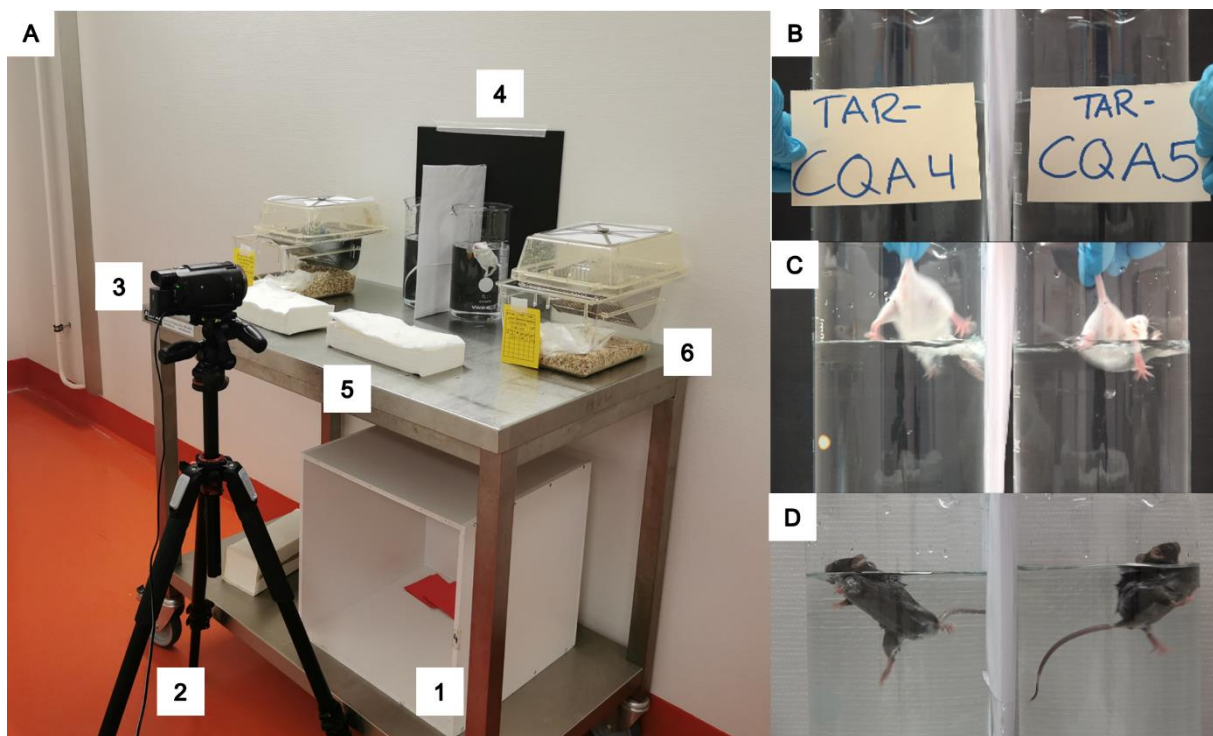


Abbildung 23: Der Aufbau vom Schwimmtest (FST, A). Metalltisch (1). Stativ (2). Kamera mit Speicherkarte (3). Rückwand, Becherglas und Trennwand (4). Papiertücher um die Tiere zu trocknen (5). Die Käfige sollten rechts und links vom Becherglas aufgestellt werden (6). Positionierung der Kamera sowie die Anpassung des Hintergrundes an die Fellfarbe (B-D). Zeitgleiches Einsetzen der Mäuse an der Schwanzbasis in das Becherglas (C). Bildquelle: Sandra Reichel, 2023.

Eine Videokamera wurde auf einem Stativ vor den Bechergläsern aufgestellt. Die Kamera wurde so positioniert, dass die Pfoten der Maus gut erkennbar waren. Der Kamerazoom war frontal auf das Becherglas eingestellt. Es ist irrelevant, das gesamte Becherglas zu sehen (Abbildung 23, D). Der Winkel zur Wasseroberfläche betrug 0° . Eine Trennwand wurde zwischen den Bechergläsern aufgestellt, so dass die Tiere sich nicht gegenseitig beobachten oder ablenken konnten. Wie bereits bei den vorherigen Tests erwähnt, wurde der Hintergrund so gewählt, dass ein großer Kontrast entstand. Bei weißen Mäusen wurde ein schwarzer und bei schwarzen Mäusen ein weißer Hintergrund (weiße Wand) gewählt. Um das Becherglas mit 1500 mL Wasser zu füllen, wurde dieses unter den Wasserhahn gestellt. Mit einem digitalen Thermometer wurde die Wassertemperatur beim Einfüllen kontrolliert. Diese betrug zwischen 23 und 25 °C. Das Wasser wurde nach jedem dritten Tier ausgetauscht. Anschließend wurden die Bechergläser auf die vorhergesehene Position gestellt und eine Probeaufnahme wurde gestartet. Diese war wichtig, um Fehler im Zoom oder in der Positionierung des Becherglases festzustellen und auszubessern.

Wie auch bei den anderen Verhaltenstest zuvor, war der Versuchsstart morgens (09:00 Uhr). Die Tiere verblieben im Haltungsraum und wurden erst unmittelbar vor Versuchsstart in den Experimentalraum gebracht. Die Käfige standen rechts und links von den Bechergläsern. Die Mäuse wurden auf den Käfigdeckel gesetzt. Anschließend wurde die Videoaufzeichnung gestartet. Die Tier-IDs wurden in die Kamera gehalten. Daraufhin konnten die Tiere an der Schwanzbasis ins Wasser abgelassen werden (Abbildung 23, C - D). Dieser Test war der einzige, bei dem es noch notwendig war, die Maus am Schwanz zu fixieren. Die Stoppuhr wurde gestartet. Während der 6-minütigen Versuchsdauer saß der Experimentator im Raum. Er saß so weit weg, dass die Tiere ihn nicht wahrnahmen, er jedoch noch zeitnah eingreifen konnte. Trieb die Maus länger als 30 Sekunden im Wasser, ohne sich zu bewegen, wurde der Versuch abgebrochen und die Maus wurde aus dem Wasser geholt. Ließ sich die Maus jedoch weniger als 30 Sekunden am Stück treiben und begann dann wieder zu schwimmen, wurde sie erst nach Ablauf der 6 Minuten aus dem Wasser geholt. Die Aufzeichnung wurde gestoppt und die Maus wurde mittels Hand Cupping Methode aus dem Wasser geholt. Bevor sie in den Käfig zurückgesetzt wurde, wurde sie auf Papiertücher gesetzt, um das überschüssige Wasser zu entfernen. 15 Minuten nach dem FST wurden die Mäuse euthanasiert. Im Anschluss wurde mittels Herzpunktion das Blut entnommen.

3.13 BLUTENTNAHME

Die Tiere wurden 15 Minuten nach dem FST mittels CO₂ euthanasiert. Dazu verblieben die Tiere in ihrem Heimatkäfig mit den gesamten Anreicherungen. Mit einer Einflussrate von 20 % des Kammervolumens pro Minute wurde das CO₂ geräuschlos in den Käfig geleitet. Nachdem das Tier euthanasiert wurde, wurde es aus dem Käfig geholt. Auf dem Rücken liegend, wurde mit einer 22 G Kanüle das Herz punktiert (Abbildung 24).

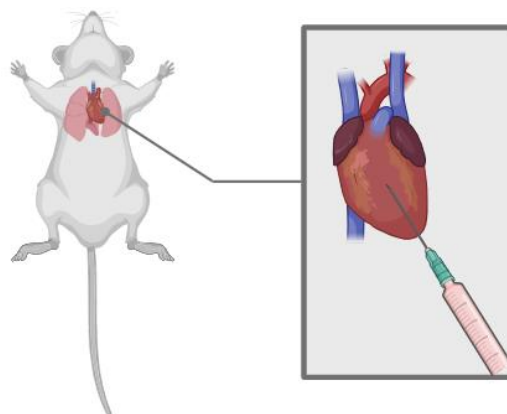


Abbildung 24: Blutentnahme durch Herzpunktion. (Erstellt mit BioRender.com).

Es wurden mindestens 200 µL Vollblut entnommen und in Probengefäße mit EDTA auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten, bei Raumtemperatur (RT), bei 3000 × g zentrifugiert. Durch diesen Vorgang trennt sich das Blutplasma von den festen Blutzellen. Für jede Probe wurden zwei Reaktionsgefäße vorbereitet. In das erste Gefäß kamen 100 µL Blutplasma als Reserve, in das zweite 10 µL, welche später direkt im Analysekit verwendet werden konnten. Die Proben wurden anschließend bei - 20 °C zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

3.14 CORTICOSTERON ELISA

Im vorherigen Abschnitt wurde erklärt, wie die Proben gewonnen wurden. Im Rahmen dieses Abschnittes soll die Durchführung der Analyse dieser Proben anhand des ELISA Kits von ENZO (Corticosteron ELISA Kit, ADI-900-097(ENZO, 15.10.2024)) beschrieben werden. Das Blutplasma soll auf die Hormonkonzentration von Corticosteron mittels Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) untersucht werden.

Das komplette Kit wurde aus dem Kühlschrank (4 °C) geholt und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) akklimatisiert. Bei der Lagerung im Kühlschrank bilden sich Kristalle in den Reagenzien, welche sich lösen, sobald sie RT angenommen haben. Die Blutplasmaproben wurden ebenfalls aus dem Gefrierschrank (-20° C) geholt, damit diese auftauen konnten. Währenddessen konnten der Assay Puffer, der Waschpuffer, die Standards und die Steroid Displacement Reagent (SDR) Lösung angesetzt werden. Der Assay Puffer wurde wie folgt verdünnt: 90 mL deionisiertes Wasser und 10 mL Assay Puffer Konzentrat. Als Nächstes wurde der Waschpuffer angesetzt. Diese Verdünnung bestand aus 95 mL deionisiertem Wasser und 5 ml Waschpuffer Konzentrat. Eine Verdünnungsreihe wurde für die Corticosteron-Standards erstellt, mit den folgenden Konzentrationen: 20.000 pg/mL (# 1), 4.000 pg/mL (# 2), 800 pg/mL (# 3), 160 pg/mL (# 4) und 32 pg/mL (# 5). Die Ausgangsstandardkonzentration vom Kit beträgt 200.000 pg/ml (Abbildung 25).

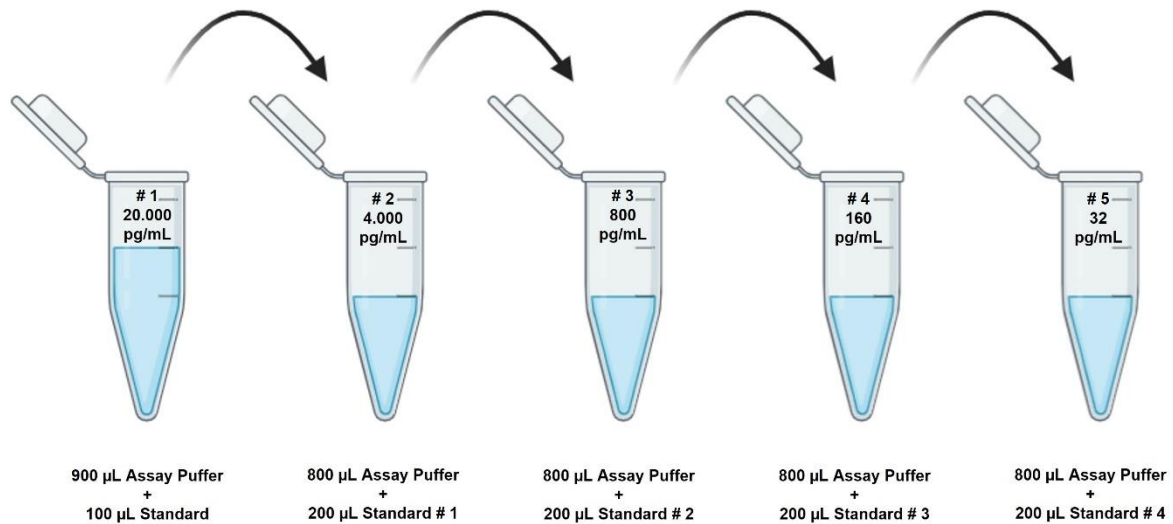


Abbildung 25: Verdünnungsreihe der Corticosteron Standards. Der Assay-Puffer wird zu Beginn in allen Reaktionsgefäßen vorgelegt. Anschließend werden in # 1 100 µL vom Standard aus dem Kit (200.000 pg/mL) hinzu pipettiert und gevortext. Aus # 1 werden 200 µL abgenommen, in # 2 pipettiert und gevortext. Aus # 2 werden 200 µL abgenommen, in # 3 pipettiert und gevortext. Aus # 3 werden 200 µL abgenommen, in # 4 pipettiert und gevortext. Aus # 4 werden 200 µL abgenommen, in # 5 pipettiert und gevortext (Erstellt mit BioRender.com).

Bei geringen Hormonkonzentrationen muss das Corticosteron zur Verwendung im Kit noch freigesetzt werden. Dafür wurde eine 1:100 Steroid Displacement Reagent (SDR) Lösung angesetzt. Es werden 990 µL deionisiertes Wasser vorgelegt in welches 10 µL des SDR hinzukamen. Zu jeder Probe wurden 10 µL von dieser verdünnten Lösung zugegeben. Die Proben wurden zuvor bereits in einem Volumen von 10 µL aufbewahrt. Somit konnte die SDR Lösung direkt auf die Probe (10 µL Probe + 10 µL SDR) gegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 5 Minuten, wurde die Reaktion mit 380 µL Assay Puffer abgestoppt. Die Endkonzentration beträgt 1:40. Das Gesamtvolumen pro Reaktionsgefäß lag nun bei 400 µL. Nachdem alle Lösungen angesetzt und die Vorbereitungen getroffen waren, konnte die 96-well Platte pipettiert werden (Abbildung 87). Es wurden von allen Proben Doppelbestimmungen angefertigt.

- Es wurden 100 µL vom Assay Puffer in die NSB und B₀ (0 pg/mL Standard) Wells pipettiert.
- Es wurden 100 µL von Standard # 1 bis # 5 in die dafür vor gesehenen Wells pipettiert.
- Es wurden 100 µL von jeder Probe in die dafür vor gesehenen Wells pipettiert.
- Es wurden 50 µL vom Assay Puffer in die NSB Wells pipettiert.
- Es wurden 50 µL vom blauen Konjugat in jedes Well, außer Blank und TA pipettiert.
- Es wurden 50 µL vom gelben Konjugat in jedes Well, außer Blank, TA und NSB pipettiert.

Nachdem alles in die Platte vorgelegt wurde, waren alle Wells grün außer NSB (nichtspezifische Bindungsstellen), welche eine blaue Farbe aufwiesen. Die Blank (Kontrollprobe/Referenzprobe) und die TA (Totale Aktivität) Wells waren jetzt noch leer und somit farblos. Die Platte wurde mit der dabei liegenden Folie aus dem Kit verschlossen und auf den Schüttler (~ 500 rpm) bei RT gestellt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurde die Folie entfernt, die Platte ausgekippt und 3 x mit 400 µL Waschpuffer pro Well gewaschen.

- Es wurden 5 µL von dem blauen Konjugat in die TA Wells pipettiert.
- Es wurden 200 µL von dem pNpp Substrat in jedes Well pipettiert.

Die Proben in der Platte wurden anschließend mit Parafilm abgedeckt und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert (ohne Schüttler). In dieser Zeit wurden das Programm (i-control von Tecan) und das Messgerät gestartet. Gemessen wurde bei einer Absorption von 405 nm. Am Ende der Inkubationszeit, wurde die Reaktion mit der Stopplösung (50 µL pro Well) abgestoppt. Die Absorption wurde unmittelbar danach gemessen.

3.15 AUSWERTUNG ELISA

Die Auswertung erfolgte manuell anhand des Handbuches des Kits. Die gemessenen Absorptionswerte bei 405 nm wurden in eine Excel Tabelle übertragen. Der erste Schritt war die Berechnung des Mittelwertes ($A1+B1$ =Mittelwert von A und B) der Absorptionsmessung (Abbildung 26).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2	Platte 1 0315200100783												
3		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4	A	0,143800005	0,239399999	0,716400027	0,400200009	0,402799994	0,269400001	0,407099992	0,412999988	0,346199989	0,421499997		
5	B	0,147699997	0,243900001	0,675800025	0,404799998	0,388399988	0,351599991	0,411700001	0,409799993	0,350199997	0,424899995		
6	C	0,386500001	0,3398	0,3759	0,423200011	0,413300008	0,358000001	0,419400007	0,368900001	0,490000001	0,596199989		
7	D	0,426299989	0,334800005	0,372500002	0,400700003	0,403400004	0,336100012	0,416399986	0,370700002	0,469199985	0,595399976		
8	E	0,148399994	0,475699991	0,385899991	0,369700015	0,416099995	0,360599995	0,390399992	0,413100004	0,401499987	0,393099993		
9	F	0,148100004	0,475199997	0,387699991	0,353500009	0,397899985	0,374700001	0,385899991	0,411900014	0,388500005	0,395999998		
10	G	0,746900022	0,613399982	0,389299989	0,3671	0,357800007	0,371600002	0,449999988	0,525300026	0,533100009			
11	H	0,741699994	0,573199987	0,376100004	0,356400013	0,353500009	0,345699996	0,430099994	0,480599999	0,496800005			
12													
13													
14													
15	Mittelwert												
16		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
17	A	0,145750001	0,24165	0,696100026	0,402500004	0,395599991	0,310499996	0,409400001	0,41139999	0,348199993	0,423199996		
18	B												
19	C	0,406399995	0,337300003	0,374200001	0,411950007	0,408350006	0,347050011	0,417899996	0,369800001	0,479599997	0,595799983		
20	D												
21	E	0,148249999	0,475449994	0,386799991	0,361600012	0,40699999	0,367650002	0,388149992	0,412500009	0,394999996	0,394549996		
22	F												
23	G	0,744300008	0,593299985	0,382699996	0,361750007	0,355650008	0,358649999	0,440049991	0,502950013	0,514950007			
24	H												

Gemessene Absorption bei 405 nm

Mittelwerte der gemessene Absorption bei 405 nm

Abbildung 26: Berechnung des Mittelwertes von der gemessenen Absorption mittels Excel. Die gemessenen Absorptionen bei 405 nm werden in einer Excel Tabelle eingetragen um den Mittelwert zu berechnen.

Die berechneten Mittelwerte oder Mean OD wurden in eine zweite Tabelle übertragen.

Sample	Mean OD	Mean OD (-Blank)	Average Net OD	Percent Bound	Corticosterone (pg/mL)
Blank	0.14575	0			
TA	0.4064	0.260649994			
NSB	0.14825	0.002499998	0		
B0	0.7443	0.598550007	0.596050009	100.00	0
Standard 1	0.24165	0.095899999	0.093400002	15.67	20000
Standard 2	0.3373	0.191550002	0.189050004	31.72	4000
Standard 3	0.47545	0.329699993	0.327199996	54.89	800
Standard 4	0.5933	0.447549984	0.445049986	74.67	160
Standard 5	0.6961	0.550350025	0.547850028	91.91	32

Abbildung 27: Übertragung der Mittelwerte der gemessenen Absorption.

Danach wurde vom Mean OD Wert der Blank abgezogen. Der Blank ist der Referenzwert zu der Lösung mit dem Para-Nitrophenylphosphat. Die Bindungen oder Reaktionen, welche nicht gewollt sind werden abgezogen.

$$\text{Mean OD (-Blank)} = \text{Mean OD} - \text{Blank Mean OD}$$

Sample OD	Mean OD	Mean OD (-Blank)	Average Net OD	Percent Bound	Corticosterone (pg/mL)
Blank	0,14575	0			
TA	0,4064	0,260649994			
NSB	0,14825	0,002499998	0		
B0	0,7443	0,598550007	0,596050009	100,00	0
Standard 1	0,24165	0,095899999	0,093400002	15,67	20000
Standard 2	0,3373	0,191550002	0,189050004	31,72	4000
Standard 3	0,47545	0,329699993	0,327199996	54,89	800
Standard 4	0,5933	0,447549984	0,445049986	74,67	160
Standard 5	0,6961	0,550350025	0,547850028	91,91	32

Abbildung 28: Berechnung des Mean OD (-Blank).

Mittels des Mean OD (- Blank) Werts konnte die Average Net OD berechnet werden.

$$\text{Average Net OD} = \text{Mean OD(-Blank)} - \text{NSB Mean OD(-Blank)}$$

Sample OD	Mean OD	Mean OD (-Blank)	Average Net OD	Percent Bound	Corticosterone (pg/mL)
Blank	0,14575	0			
TA	0,4064	0,260649994			
NSB	0,14825	0,002499998	0		
B0	0,7443	0,598550007	0,596050009	100,00	0
Standard 1	0,24165	0,095899999	0,093400002	15,67	20000
Standard 2	0,3373	0,191550002	0,189050004	31,72	4000
Standard 3	0,47545	0,329699993	0,327199996	54,89	800
Standard 4	0,5933	0,447549984	0,445049986	74,67	160
Standard 5	0,6961	0,550350025	0,547850028	91,91	32

Abbildung 29: Berechnung der Average Net OD.

Die ersten beiden Rechnungen dienen dazu, dass der Blank und die nicht spezifischen Bindungsstellen abgezogen werden. Als Nächstes wurden die Bindungsstellen des Corticosterons anhand der Verdünnungsreihe der Standards berechnet. Der Wert B₀ hat einen Percent Bound von 100 % d. h. Corticosteron kann daran nicht binden. Anhand des Wertes wurde nun die Percent Bound der Standards berechnet werden.

$$\text{Percent Bound} = \frac{\text{Average Net OD}}{\text{Average Net OD } B_0} \times 100$$

Sample OD	Mean OD	Mean OD (-Blank)	Average Net OD	Percent Bound	Corticosterone (pg/mL)
Blank	0,14575	0			
TA	0,4064	0,260649994			
NSB	0,14825	0,002499998	0		
B0	0,7443	0,598550007	0,596050009	100,00	0
Standard 1	0,24165	0,095899999	0,093400002	15,67	20000
Standard 2	0,3373	0,191550002	0,189050004	31,72	4000
Standard 3	0,47545	0,329699993	0,327199996	54,89	800
Standard 4	0,5933	0,447549984	0,445049986	74,67	160
Standard 5	0,6961	0,550350025	0,547850028	91,91	32

Abbildung 30: Berechnung der Bindung des Cortikosterons in Prozent (Percent Bound).

Da die Corticosteronkonzentrationen von den Standards bekannt war, wurden diese nun in einem Punktediagramm (XY) eingefügt. Die B₀-Werte wurden auf der Y-Achse und die Corticosteronkonzentration (pg/mL) wurde auf der X-Achse dargestellt. Eine Standardkurve konnte nun angezeigt werden. Die X - Achse wurde mittels einer logarithmischen Skalierung formatiert, so dass eine logarithmische Trendlinie, die Formel sowie das Bestimmtheitsmaß hinzugefügt wurden. Eine Gerade war nun das Resultat (Abbildung 31, roter Kasten).

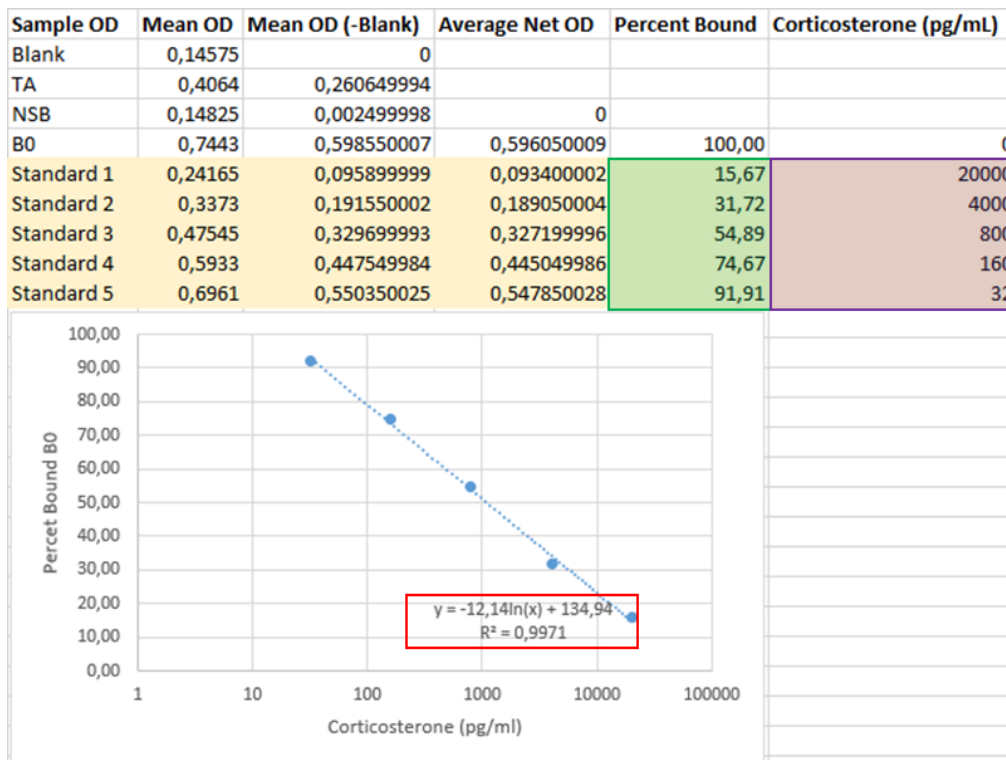


Abbildung 31: Bestimmung der Formel zur Berechnung der Corticosteronkonzentration.

Mit dieser Formel konnten die unbekannt Proben bestimmt werden. Im Folgenden wird die Umstellung nach X, der Corticosteronkonzentration, beschrieben.

$$y = -12,14 \ln(x) + 134,94$$

$$y = -12,14 \ln(x) + 134,94 \quad | - 134,94$$

$$y - 134,94 = -12,14 \ln(x) \quad | \times \left(-\frac{1}{12,14}\right)$$

$$\left(-\frac{1}{12,14}\right) \times y + \frac{134,94}{12,14} = \ln(x) \quad | \times e$$

$$e^{\left(\left(-\frac{1}{12,14}\right) \times y + \frac{134,94}{12,14}\right)} = x$$

$$x = \text{Corticosteronkonzentration} \left(\frac{\text{pg}}{\text{mL}}\right)$$

3.16 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 9 (Version 9.4.1 (681), Juli 21, 2022). Alle Fehlerbalken in den Abbildungen zeigen den Mittelwert mit dem Standardfehler (\pm SEM). In dieser Studie haben alle nicht signifikanten Ergebnisse einen P-Wert von $> 0,05$, signifikante Ergebnisse einen P-Wert von $< 0,05$ und hochsignifikante Ergebnisse haben einen P-Wert von $< 0,001$. Es sind nur Signifikanzwerte angegeben, die auch signifikant sind. Die nicht signifikanten Werte sind nicht in den Grafiken dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1 ERSTER VERSUCHSTEIL: 10 MINUTEN KLICKEREINFÜHRUNG MIT EINMALIGEM KLICKERTRAINING DER MÜTTER (PROTOKOLL A) DES AUSZUCHTSTAMMES CRL:CD1(ICR).

In diesem Versuchsteil wird der Effekt des Klickertrainings auf Mütter sowie deren Nachkommen bei einer Klickereinführungszeit von 10 Minuten untersucht. Es wird untersucht, ob ein einmaliges Klickertraining der Mütter ausreicht und ob ein zusätzliches Klickertraining der Nachkommen sinnvoll ist, um das Depressions-assoziierte Verhalten der Nachkommen zu verringern sowie deren Wohlbefinden und die Interaktion mit dem Experimentator zu verbessern.

4.1.1 GEWICHTSZUNAHME DER NACHKOMMEN WÄHREND DEM KLICKERTRAINING

In diesem Abschnitt soll das Körpergewicht zur Bestimmung des Wohlbefindens der Tiere evaluiert werden. In Abbildung 32 wird gezeigt, dass alle Tiere während des Klickertrainings an Gewicht zunehmen (M+N+ $3,6 \pm 0,6$ %, M+N- $3,6 \pm 0,5$ %). Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Gewichtszunahme (Beider Geschlechter) bei den trainierten (M+N+) und untrainierten Nachkommen (M+N-) nach dem Klickertraining (unpaired t - test zeigt keine signifikante Gewichtszunahme weder im Klickertraining der Nachkommen noch im Training der Mütter). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes (Abbildung 32 B/C) gibt es eine signifikant geringere Gewichtszunahme nach dem Klickertraining von trainierten männlichen Nachkommen (M+N+), jedoch nicht bei den weiblichen Nachkommen (M+N+). Die männlichen Nachkommen, welche trainiert wurden (M+N+ $3,5 \pm 0,4$ %), haben signifikant weniger an Gewicht zugenommen (M+N- $4,9 \pm 0,3$ %), als die untrainierten Nachkommen (unpaired t-test, $P = 0,0138$). Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass die trainierten Männchen zu- und nicht abnahmen. Bei den weiblichen Tieren ist kein signifikanter Unterschied in der Zunahme des Gewichtes zwischen trainierten und untrainierten Nachkommen vorhanden. Es ist jedoch eine Tendenz zu erkennen, dass die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern mehr Körpergewicht zunehmen (M+N- $1,7 \pm 0,9$ %, M+N+ $3,5 \pm 1,1$ %).

Gewichtszunahme während des Trainings

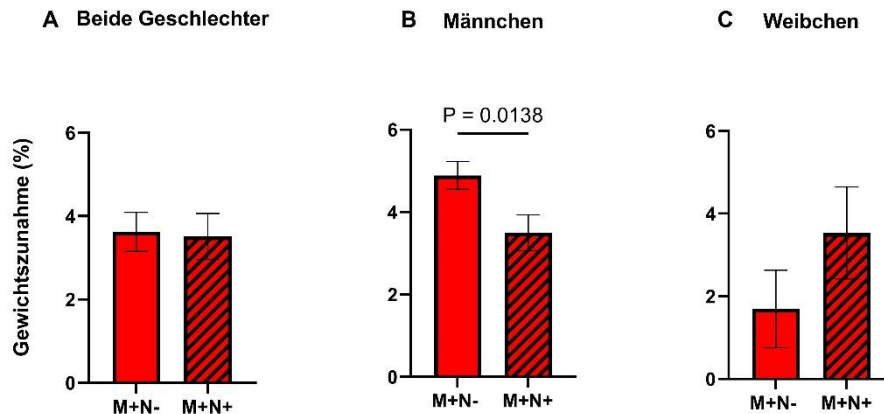


Abbildung 32: Gewichtszunahme der Nachkommen in Prozent nach einmaligem Training der Mütter (Protokoll A, 10 Minuten). Es ist die Gewichtszunahme beider Geschlechter **(A)** sowie die Zunahme aufgeteilt nach männlichem **(B)** und nach weiblichem Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M+N- Gruppe (n=58), M+N+ Gruppe (n=64). **(B)** M+N- Gruppe (n=35), M+N+ Gruppe (n=35). **(C)** M+N- Gruppe (n=23), M+N+ Gruppe (n=29). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.1.2 TRAININGSERFOLGE DER NACHKOMMEN

In diesem Abschnitt wird der Erfolg des Klickertrainings anhand der Häufigkeit der Wiederholungen evaluiert. Abbildung 33 zeigt die Häufigkeit des Trainingsverhaltens der Nachkommen pro Tag. Alle Tiere (Beide Geschlechter) zeigen eine signifikante Zunahme der Trainingshäufigkeit ab dem zweiten Trainingstag (unpaired t-test, $P = 0,0132$). Die trainierten Nachkommen von Müttern, die selbst trainiert sind, verbessern kontinuierlich ihr Trainingsverhalten (Tag 1 $0,5 \pm 0,1$, Tag 2 $1,0 \pm 0,2$, Tag 3 $1,5 \pm 0,3$, Tag 4 $2,2 \pm 0,4$). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes, zeigen die trainierten, männlichen Nachkommen (Abbildung 33 B) erst ab dem dritten Trainingstag eine signifikante Zunahme (unpaired t-test, $P = 0,0124$). Alle trainierten, männlichen Nachkommen können ihre Häufigkeiten verbessern (Tag 1 $0,5 \pm 0,2$, Tag 2 $0,7 \pm 0,2$, Tag 3 $1,3 \pm 0,3$, Tag 4 $1,7 \pm 0,3$). Die weiblichen, trainierten Nachkommen (Abbildung 33 C) zeigen bereit ab dem zweiten Tag eine signifikante Zunahme der Trainingserfolge (unpaired t-test, $P = 0,0142$). Sie können ihr Trainingsverhalten mit jedem Tag verbessern (Tag 1 $0,5 \pm 0,2$, Tag 2 $1,4 \pm 0,3$, Tag 3 $1,8 \pm 0,5$, Tag 4 $2,8 \pm 0,7$). Bei beiden Geschlechtern konnte bis zum vierten Tag ein stetiger Anstieg nachgewiesen werden ($0,5 < 1,0 < 1,5 < 2,2$).

Klickertraining der Nachkommen (Protokoll A)

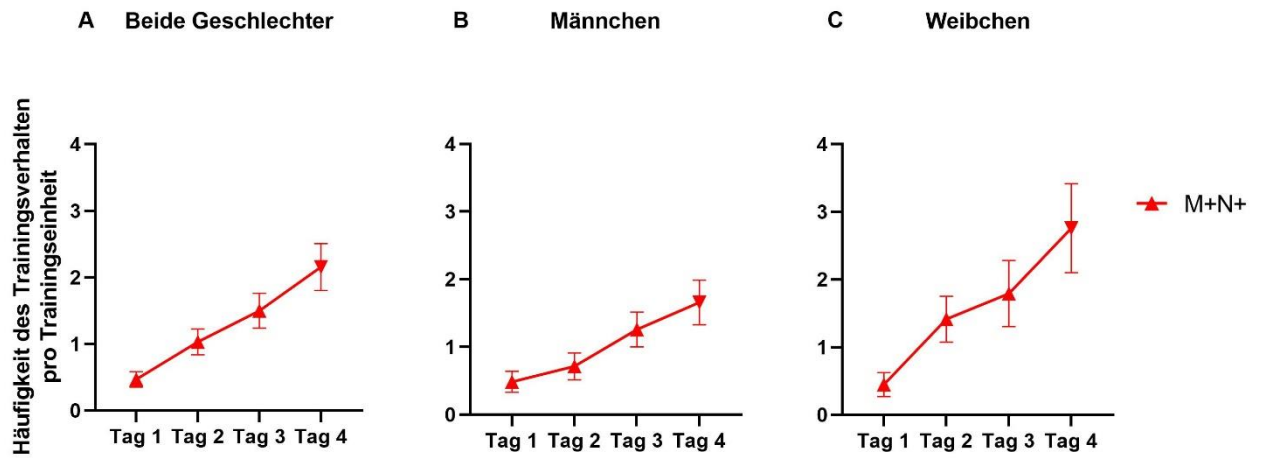


Abbildung 33: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten Crl:CD1(ICR) Nachkommen. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens beider Geschlechter **(A)** sowie die Häufigkeit aufgeteilt nach dem männlichen **(B)** und dem weiblichen Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M+N+ Gruppe (n=64). **(B)** M+N+ Gruppe (n=35). **(C)** M+N+ Gruppe (n=29). Alle Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.1.3 EINFLUSS DES KLICKERTRAININGS AUF DIE INTERAKTIONSZEIT MIT DEM EXPERIMENTATOR

In diesem Abschnitt wird das Wohlbefinden der Tiere anhand der Interaktion mit dem Experimentator evaluiert. Die Auswertung der Interaktionszeit (Abbildung 34, Abbildung 35) zeigt keinen Unterschied, ob die Mütter zuvor trainiert wurden. Bei der Differenzierung des Geschlechtes in männliche und weibliche Tiere, konnte ebenfalls kein Unterschied in der Interaktionszeit nachgewiesen werden. Die Nachkommen von trainierten Müttern, die selbst trainiert sind, interagieren für eine ähnlich lange Zeit wie die Nachkommen von trainierten Müttern, die nicht trainiert sind. Lediglich die Dauer der Interaktionszeit nach dem Klickertraining (M+N- $9,1 \pm 0,9$ Sek., M+N+ $10,7 \pm 0,6$ Sek.) nimmt im Vergleich zu vor dem Klickertraining (M+N- $4,5 \pm 0,4$ Sek., M+N+ $4,6 \pm 0,3$ Sek.) zu.

Test auf Interaktion vor dem Training

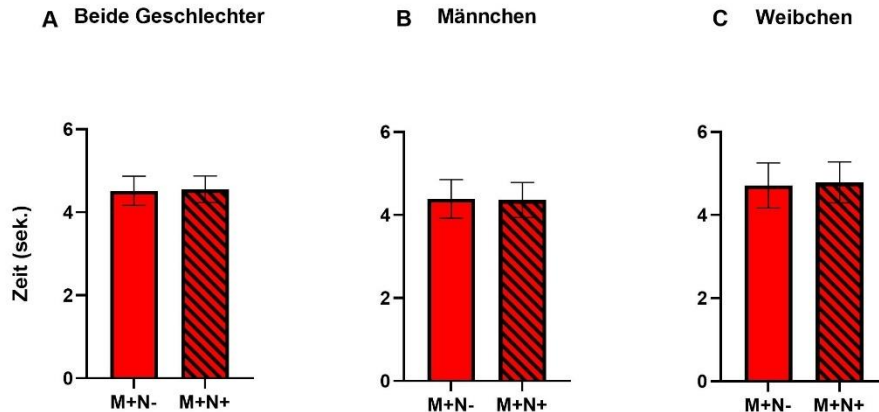


Abbildung 34: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator des Crl:CD1(ICR) Stammes vor dem Klickertraining. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Interaktion aller Tiere mit dem Experimentator **(A)** sowie die Interaktion aufgeteilt nach männlichem **(B)** und nach weiblichem Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M+N+ Gruppe (n=64), M+N- Gruppe (n=58). **(B)** M+N+ Gruppe (n=35), M+N- Gruppe (n=35). **(C)** M+N+ Gruppe (n=29), M+N- Gruppe (n=23). Alle Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Test auf Interaktion nach dem Training

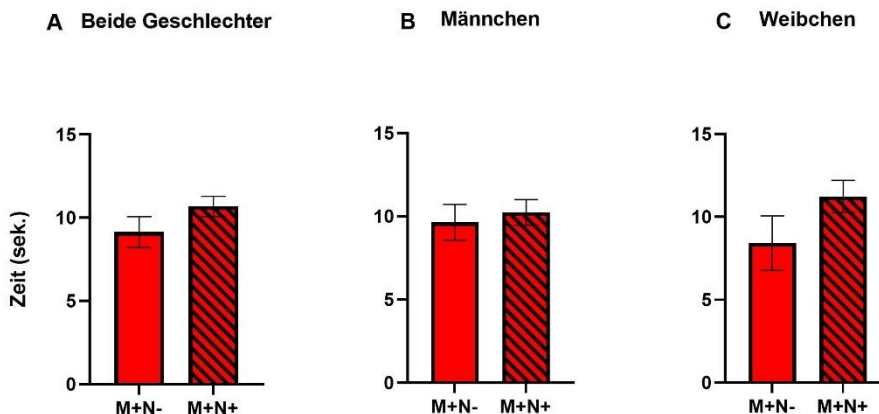


Abbildung 35: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator des Crl:CD1(ICR) Stammes nach dem Klickertraining. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Interaktion aller Tiere mit dem Experimentator **(A)** sowie die Interaktion aufgeteilt nach männlichem **(B)** und nach weiblichem Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M+N+ Gruppe (n=64), M+N- Gruppe (n=58). **(B)** M+N+ Gruppe (n=35), M+N- Gruppe (n=35). **(C)** M+N+ Gruppe (n=29), M+N- Gruppe (n=23). Alle Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.1.4 NESTBAUVERHALTEN DER NACHKOMMEN

In diesem Abschnitt wird das Wohlbefinden der Tiere mittels Nestbauverhalten evaluiert. Die Auswertung (Abbildung 36) zeigt einen signifikanten höheren Nestbau Score (unpaired t - test, $P = 0,0036$) bei trainierten (M+N+ $3,7 \pm 0,1$) als bei untrainierten (M+N- $3,2 \pm 0,1$) Nachkommen. Dieser signifikant höhere Nestbau Score von trainierten Nachkommen, konnte auch bei den männlichen Nachkommen nachgewiesen werden (unpaired t - test, $P = 0,0129$). Die männlichen, trainierten Tiere (M+N+ $3,6 \pm 0,2$) zeigen einen signifikant höheren Nestbau Score, als die untrainierten Tiere (M+N- $3,2 \pm 0,1$). Weibliche, trainierte Tiere zeigen keinen Unterschied im Nestbauverhalten (M+N- $3,4 \pm 0,2$, M+N+ $3,7 \pm 0,2$). Das Klickertraining der männlichen Nachkommen sowie deren Müttern hat einen signifikanten Einfluss auf das Nestbauverhalten.

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen auf das Nestbauverhalten

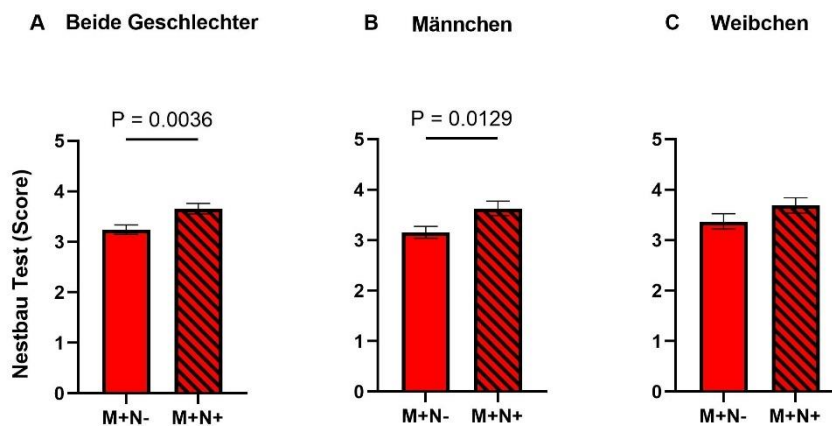


Abbildung 36: Nestbautest (Score) der Cr1:CD1(ICR) Nachkommen nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist das Nestbauverhalten beider Geschlechter (A) sowie das Verhalten aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M+N- Gruppe (n=58), M+N+ Gruppe (n=64). (B) M+N- Gruppe (n=35), M+N+ Gruppe (n=35). (C) M+N- Gruppe (n=23), M+N+ Gruppe (n=29) dargestellt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.1.5 AUSWIRKUNG DES KLICKERTRAININGS AUF DAS DEPRESSIONS-ASSOZIIERTE VERHALTEN DER NACHKOMMEN (SPT & FST)

Im folgenden Abschnitt wird das Depressions-assoziierte Verhalten der Tiere anhand der Aufnahme von Saccharose und der Immobilität evaluiert. In Abbildung 37 ist die Saccharose Präferenz in Prozent dargestellt. Das Klickertraining der Nachkommen trainierter Mütter zeigt keinen signifikanten (unpaired t - test) Unterschied in der Saccharose Präferenz (M+N- $84,5 \pm$

2,5 %, M+N+ 87,1 ± 2,0 %) als untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern. Das Klickertraining der männlichen Nachkommen von trainierten Müttern (Abbildung 37 B) zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (unpaired t-test) in der Saccharose Präferenz (M+N- 82,9 ± 3,4 %, M+N+ 87,1 ± 2,6 %) genauso wie die weiblichen Nachkommen (M+N- 86,9 ± 3,5 %, M+N+ 87,0 ± 3,1 %) (Abbildung 37 C). Das Klickertraining der Nachkommen wie auch das Training der Mütter hat keinen Einfluss auf die Saccharose Präferenz.

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen auf die Saccharose Präferenz

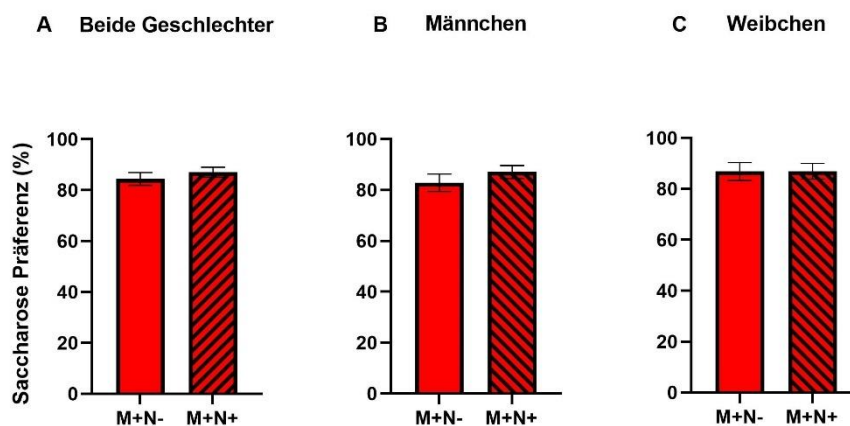


Abbildung 37: Saccharose Präferenz in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Saccharose Präferenz beider Geschlechter (A) sowie die Präferenz aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M+N- Gruppe (n=58), M+N+ Gruppe (n=64). (B) M+N- Gruppe (n=35), M+N+ Gruppe (n=35). (C) M+N- Gruppe (n=23), M+N+ Gruppe (n=29). Die Daten zeigen den Mittelwert ± SEM.

Die Auswertung (unpaired t - test) des FST (Abbildung 38) ergab, dass das Klickertraining der Nachkommen sowie das der Mütter (Beide Geschlechter) keinen signifikanten Einfluss auf die Immobilitätsdauer hat (M+N- 20,6 ± 2,4 %, M+N+ 20,3 ± 2,1 %). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes gibt es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Immobilitätsdauer. Weder das Klickertraining der männlichen (M+N- 20,3 ± 3,1 %, M+N+ 18,6 ± 2,6 %) noch das Training der weiblichen (M+N- 21,0 ± 3,8 %, M+N+ 22,6 ± 3,3 %) Nachkommen zeigt eine signifikante längere Immobilität. Ein Abbruch des Versuches erfolgt nach einer Immobilitätsphase von max. 30 Sekunden. Daher sind in der Auswertung weniger Tiere berücksichtigt. Insgesamt wurden 8 Tiere abgebrochen, darunter drei männliche sowie fünf weibliche Tiere (Männchen: M-N- n = 2, M+N+ n = 1; Weibchen: M+N- n = 3, M+N+ n=2).

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen auf den Schwimmtest (FST)

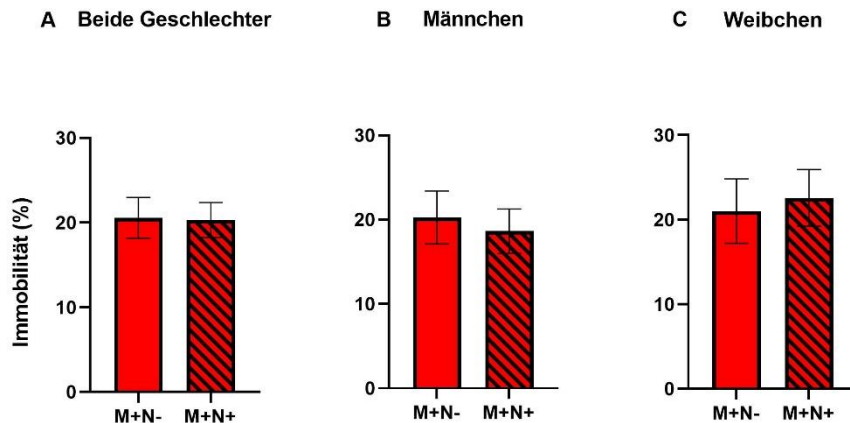


Abbildung 38: Messung der Immobilität bei 1,5 % der Aktivitätsrate in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Immobilitätsdauer beider Geschlechter (A) sowie die Dauer aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M+N- Gruppe (n=51), M+N+ Gruppe (n=59). (B) M+N- Gruppe (n=31), M+N+ Gruppe (n=34). (C) M+N- Gruppe (n=20), M+N+ Gruppe (n=25) dargestellt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.1.6 CORTICOSTERONBESTIMMUNG DER NACHKOMMEN

Die Auswertung der Corticosteronbestimmung soll das Stresslevel der Tiere evaluieren, um dann Rückschlüsse auf deren Wohlbefinden schließen zu können. Das Klickertraining der Nachkommen (Beide Geschlechter) hat ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Corticosteronkonzentration (Abbildung 39) im Blutplasma. Die Bestimmung (unpaired t-test) des Wertes nach 15 Minuten des FST ergab keinen signifikanten Unterschied in der Konzentration (M+N- 5110 ± 422 pg/mL, M+N+ $5226 \pm 500,2$ pg/mL). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes konnte ebenfalls kein Unterschied in der Corticosteronkonzentration nachgewiesen werden. Die männlichen Tiere (M+N- $3686 \pm 366,9$ pg/mL, M+N+ $4160 \pm 444,2$ pg/mL) wiesen jedoch eine geringere Konzentration im Blut auf als die weiblichen Tiere (M+N- $7529 \pm 674,2$ pg/mL, M+N+ $6405 \pm 867,2$ pg/mL).

Corticosteronkonzentration im Blut nach dem Schwimmtest (FST)

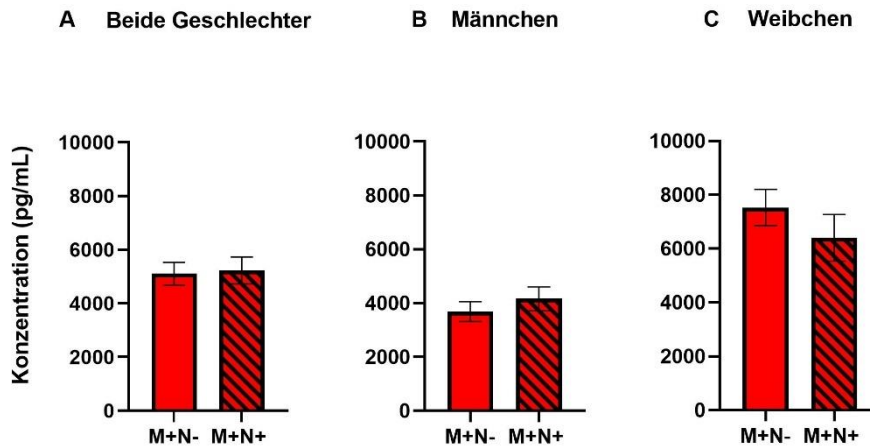


Abbildung 39: Corticosteronbestimmung mittels ELISA des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Plasmacorticosteronkonzentration beider Geschlechter (A) sowie die Konzentration aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M+N- Gruppe (n=51), M+N+ Gruppe (n=59). (B) M+N- Gruppe (n=34), M+N+ Gruppe (n=21). (C) M+N- Gruppe (n=20), M+N+ Gruppe (n=19) dargestellt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Unter Berücksichtigung aller Verhaltenstest sowie der Corticosteronbestimmungen konnte nur ein Unterschied in der Gewichtszunahme und im Nestbauverhalten der männlichen Tiere nachgewiesen werden. Die trainierten, männlichen Nachkommen nehmen an Gewicht zu aber signifikant weniger wie die untrainierten Nachkommen. Die trainierten, weiblichen Tiere zeigen lediglich eine Tendenz zu einer größeren Gewichtszunahme im Vergleich zu den nicht trainierten Tieren. Die Erfolge beim Klickertraining nehmen bei beiden Geschlechtern signifikant mit der Anzahl der Trainingstage zu. Der Test auf Interaktion zeigt keinen Unterschied in der Dauer der Interaktion mit dem Experimentator, ob die Nachkommen trainiert werden oder nicht. Jedoch nimmt die Interaktionszeit nach dem Klickertraining mit dem Experimentator zu. Das Klickertraining zeigt ebenfalls keine Auswirkungen auf den SPT sowohl in männlichen als auch in weiblichen Tieren. Ein Unterschied wurde im Nestbauverhalten der männlichen, trainierten Nachkommen nachgewiesen. Diese Tiere haben einen signifikant höheren Nestbau Score als die untrainierten Nachkommen. Die Dauer der Immobilität im FST wird durch das Klickertraining nicht beeinflusst. Die Resultate der Corticosteronbestimmung belegen, dass die Konzentration im Blut von trainierten Nachkommen nicht erhöht ist im Vergleich zu den untrainierten Nachkommen.

4.2 ZWEITER VERSUCHSTEIL: 5 MINUTEN KLICKEREINFÜHRUNG MIT EINMALIGEM KLICKERTRAINING DER MÜTTER (PROTOKOLL A) DES AUSZUCHTSTAMMES CRL:CD1(ICR).

Aufbauend auf dem ersten Versuchsteil soll untersucht werden, ob ein Klickertraining der Mütter ohne die Nachkommen zu trainieren (M+N-) ausreicht, um das Depressions- assoziierte Verhalten der Nachkommen zu reduzieren. Dafür werden zwei zusätzliche Gruppen mit in die Versuchsreihe integriert. Die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) dienen als Referenzwert, um nachweisen zu können, dass das Klickertraining Auswirkungen auf das Verhalten der Nachkommen hat. Die Gruppe der trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) soll im Vergleich zu den untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) untersucht werden. Daraus können Rückschlüsse gezogen werden, ob ein Klickertraining der Mütter ausreicht das Wohlbefinden, sowie Angst- und Depressions-assoziertes Verhalten der Nachkommen zu reduzieren. Um die Auswirkungen des Klickertrainings auf das Angst-assozierte Verhalten zu untersuchen, werden zwei weitere Verhaltenstests wie das EPM und das OF durchgeführt. Des Weiteren soll die Trainingshäufigkeit der trainierten Nachkommen von trainierten Müttern bei einer verkürzten Klickereinführungszeit von 5 Minuten untersucht werden.

4.2.1 GEWICHTSZUNAHME DER NACHKOMMEN WÄHREND DES KLICKERTRAININGS

In diesem Abschnitt soll das Körpergewicht zur Bestimmung des Wohlbefindens der Tiere evaluiert werden. Das Gewicht der verschiedenen Gruppen wurde vor und nach dem Klickertraining ermittelt. In Abbildung 40 A ist gezeigt, dass alle Tiere (Beide Geschlechter) an Gewicht zunehmen (M-N- $2,0 \pm 0,9$ %, M-N+ $5,3 \pm 1,4$ %, M+N- $1,1 \pm 1,4$ %, M+N+ $3,3 \pm 0,9$ %). Das Klickertraining der Nachkommen hat einen signifikanten Effekt auf die Gewichtszunahme (2-way ANOVA, $F_{1,43} = 5,924$, $P = 0,0192$). Das Klickertraining der Mütter sowie die Interaktion hatten keine signifikante Gewichtszunahme zur Folge. Alle männlichen Nachkommen (Abbildung 40 B) nehmen während des Klickertrainings an Gewicht zu (M-N- $2,8 \pm 1,0$ %, M+N- $1,4 \pm 3,3$ %, M-N+ $5,5 \pm 1,2$ %, M+N+ $2,9 \pm 0,7$ %). Die Zunahme ist jedoch nicht signifikant (2-way ANOVA zeigt keine Signifikanzen weder nach dem Klickertraining der Nachkommen noch nach dem Klickertraining der Mütter, sowie in der Interaktion). Durch das Training der Nachkommen kann lediglich eine Tendenz zur Gewichtszunahme nachgewiesen werden. Alle weiblichen Nachkommen (Abbildung 40 C) nehmen während dem Klickertraining an Gewicht zu (M-N- $1,2 \pm 1,6$ %, M+N- $0,9 \pm 1,2$ %, M-N+ $5,1 \pm 2,6$ %, M+N+ $3,6 \pm 1,4$ %). Die Zunahme ist jedoch nicht signifikant (2-way ANOVA zeigt keine Signifikanzen weder nach

dem Klickertraining der Nachkommen noch nach dem Klickertraining der Mütter sowie in der Interaktion). Durch das Klickertraining der Nachkommen kann lediglich eine Tendenz zur Gewichtszunahme nachgewiesen werden.

Gewichtszunahme während des Trainings

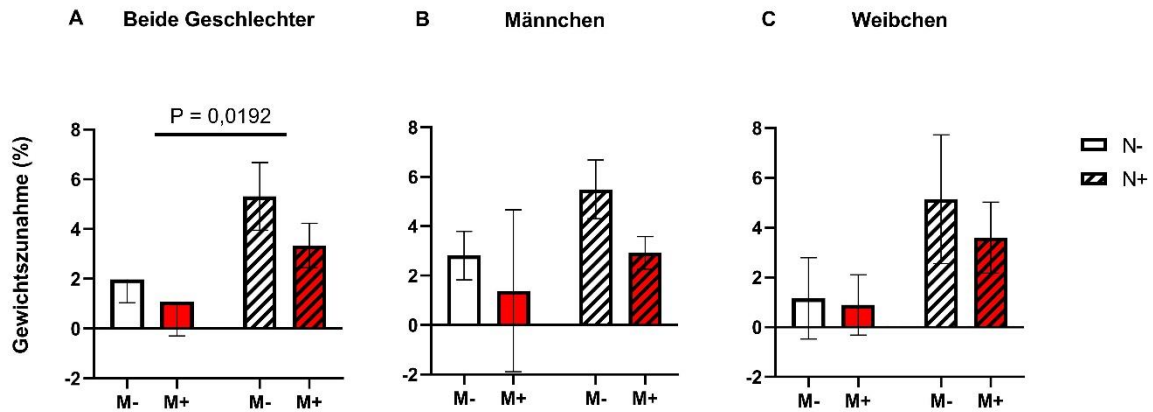


Abbildung 40: Gewichtszunahme der Nachkommen in Prozent nach einmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll A, 5 Minuten). Es ist die Gewichtszunahme beider Geschlechter (A) sowie die Zunahme aufgeteilt nach männlichem (B) und nach weiblichem Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N- Gruppe ($n=12$), M+N- Gruppe ($n=12$), M-N+ Gruppe ($n=10$), M+N+ Gruppe ($n=13$). (B) M-N- Gruppe ($n=6$), M+N- Gruppe ($n=4$), M-N+ Gruppe ($n=6$), M+N+ Gruppe ($n=5$). (C) M-N- Gruppe ($n=6$), M+N- Gruppe ($n=6$), M-N+ Gruppe ($n=6$), M+N+ Gruppe ($n=8$). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.2.2. TRAININGSERFOLGE DER NACHKOMMEN

In diesem Abschnitt wird der Erfolg des Klickertrainings anhand der Häufigkeit der Wiederholung evaluiert. In Abbildung 41 ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens der Tiere pro Tag dargestellt. Beide Geschlechter (Abbildung 41, A) zeigen eine signifikante Zunahme der Trainingshäufigkeit ab dem zweiten Trainingstag (2-way ANOVA für repeated measurements, $F_{1,9,42,92} = 8,756$, $P = 0,0008$) jedoch keinen signifikanten Effekt des Faktors Klickertraining der Mütter. Allerdings zeigen die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern eine höhere Häufigkeit des Verhaltens (M+N+ Tag 1 $1,9 \pm 0,7$, Tag 2 $7,0 \pm 1,4$, Tag 3 $7,4 \pm 2,1$ / M-N+ Tag 1 $1,4 \pm 0,7$, Tag 2 $3,8 \pm 0,9$, Tag 3 $3,8 \pm 1,7$). An Tag vier zeigen die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+ Tag 4 $5,1 \pm 1,2$) sowie die untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N- Tag 4 $2,6 \pm 1,4$) eine Abnahme im Verhalten. Diese Abnahme ist jedoch nicht signifikant. Eine Zunahme der Trainingshäufigkeiten mit den Tagen zeigt sich auch bei den männlichen Nachkommen (Abbildung 41 B) (2-way ANOVA für repeated measurements, $F_{2,2,19,41} = 3,7$, $P = 0,0407$; keinen signifikanten Effekt im Klickertraining der Mütter sowie in der Interaktion). Die Nachkommen der trainierten wie auch

der untrainierten Mütter verbessern ihr Trainingsverhalten vom ersten Tag (M-N+ $2,7 \pm 1,2$, M+N+ $2,8 \pm 1,8$) auf den zweiten Tag (M-N+ $5,5 \pm 1,3$, M+N+ $7,8 \pm 3,0$). Die Häufigkeit des Verhaltens der Nachkommen von trainierten Müttern nimmt ab Tag 3 (M+N+ $4,8 \pm 2,7$) und Tag 4 (M+N+ $3,2 \pm 1,4$) wieder ab. Wohingegen die Nachkommen der untrainierten Mütter an Tag 3 (M-N+ $6,7 \pm 3,1$) häufiger das erlernte Verhalten zeigen als die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern. Die trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern zeigen erst ab Tag 4 eine Reduktion des Trainingsverhaltens (M-N+ $4,7 \pm 2,6$). Eine Zunahme der Trainingshäufigkeit mit den Tagen zeigt sich auch bei den weiblichen Nachkommen (Abbildung 41, C). Die Zunahme der Trainingshäufigkeit ist ab dem zweiten Trainingstag signifikant größer (2-way ANOVA für repeated measurements, $F_{1,6,19,02} = 5,475$, $P = 0,0182$; einen signifikanten Effekt im Klickertraining der Mütter $F_{1,12} = 7,125$, $P = 0,0204$; sowie in der Interaktion $F_{3,36} = 3,443$, $P = 0,0267$). Die weiblichen, trainierten Nachkommen von trainierten Müttern zeigen eine größere Häufigkeit des Trainingsverhaltens als die Nachkommen von nicht trainierten Müttern (M+N+ Tag 1 $1,4 \pm 0,5$, Tag 2 $6,5 \pm 1,5$, Tag 3 $9,0 \pm 3,0$ / M-N+ Tag 1 $0,2 \pm 0,2$, Tag 2 $2,2 \pm 1,0$, Tag 3 $0,8 \pm 0,7$). An Tag vier zeigen die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+ Tag 4 $6,3 \pm 1,7$) eine Abnahme des Verhaltens, welches jedoch nicht signifikant ist. Die trainierten Nachkommen von nicht trainierten Müttern zeigen bereits ab Tag 3 eine Abnahme (M-N+ Tag 3 $0,8 \pm 0,7$, Tag 4 $0,5 \pm 0,2$) des Verhaltens, welches ebenfalls nicht signifikant ist.

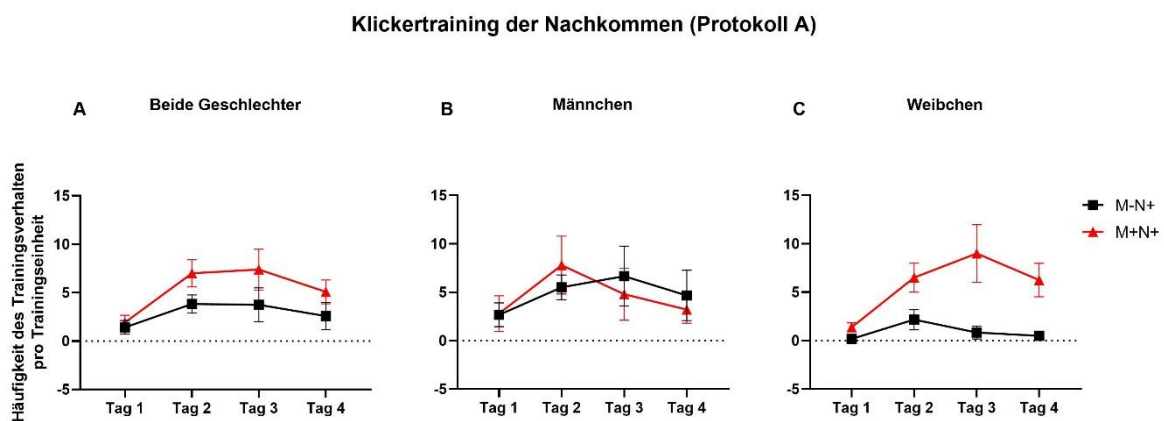


Abbildung 41: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten Crl:CD1(ICR) Nachkommen. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt, mit einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). Es ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens beider Geschlechter **(A)** sowie die Häufigkeit aufgeteilt nach dem männlichen **(B)** und dem weiblichen Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=13). **(B)** M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=5) **(C)** M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=8). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.2.3 VERGLEICH DER TRAININGSERFOLGE DER NACHKOMMEN MIT EINER KLICKEREINFÜHRUNGSZEIT VON 5 UND 10 MINUTEN

Die Häufigkeiten des Trainingsverhaltens mit einer Einführungszeit von 5 Minuten wird mit den Häufigkeiten der 10-minütigen Einführung in Abbildung 42 verglichen. Bei einer Einführungszeit von 10 Minuten ist ein stetiger aber geringer Anstieg messbar. Bei der Einführungszeit von 5 Minuten gibt es einen Anstieg an der Häufigkeit der Trainingserfolge bis zum dritten Tag. An Tag 4 nimmt die Häufigkeit zwar ab, diese ist dennoch größer als bei der 10-minütigen Einführungszeit. Eine signifikante Zunahme der Trainingshäufigkeit ab dem zweiten Trainingstag ist bei einer 5-minütigen Einführungszeit nachgewiesen worden (2-way ANOVA für repeated measurements, $F_{3,225} = 23,97$, $P < 0,0001$). Des Weiteren hat die 5-minütige Einführung einen signifikanten Effekt auf die Einführungszeit ($F_{1,75} = 36,91$, $P < 0,0001$) sowie die Interaktion ($F_{3,225} = 14,23$, $P > 0,0001$). Die Einführungszeit von 5 Minuten zeigt mit jedem Tag eine größere Häufigkeit an erlernten Trainingserfolgen (Tag 1 $1,9 \pm 0,7$, Tag 2 $7,0 \pm 1,4$, Tag 3 $7,4 \pm 2,1$, Tag 4 $5,1 \pm 1,2$) als die 10-minütige Einführungszeit (Tag 1 $0,5 \pm 0,1$, Tag 2 $1,0 \pm 0,2$, Tag 3 $1,5 \pm 0,3$, Tag 4 $2,2 \pm 0,4$). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes zeigen die männlichen Tiere ebenfalls eine signifikante Zunahme der Trainingshäufigkeit ab dem zweiten Trainingstag bei einer Einführungszeit von 5 Minuten (2-way ANOVA für repeated measurements, $F_{3,114} = 10,48$, $P < 0,0001$; einen signifikanten Effekt im Faktor Einführungszeit, $F_{1,38} = 18,09$, $P < 0,0001$, sowie in der Interaktion, $F_{3,114} = 12,95$, $P > 0,0001$). Am dritten Trainingstag sinkt die Anzahl der Häufigkeiten. Diese ist dennoch größer als bei einer 10-minütigen Einführung. Ab dem 4. Tag gibt es keinen signifikanten Unterschied bei den männlichen Nachkommen in der Trainingshäufigkeit im Vergleich von 5 (Tag 1 $2,8 \pm 1,8$, Tag 2 $7,8 \pm 3,0$, Tag 3 $4,8 \pm 2,7$, Tag 4 $3,2 \pm 1,4$) zu 10 Minuten (Tag 1 $0,5 \pm 0,2$, Tag 2 $0,7 \pm 0,2$, Tag 3 $1,3 \pm 0,3$, Tag 4 $1,7 \pm 0,3$). Die weiblichen Nachkommen weisen ab dem zweiten Trainingstag eine signifikante Steigerung der Trainingshäufigkeit auf (2-way ANOVA für repeated measurements, $F_{3,105} = 18,57$, $P < 0,0001$; einen signifikanten Effekt im Faktor Einführungszeit, $F_{1,35} = 16,54$, $P = 0,0003$, sowie in der Interaktion, $F_{3,105} = 8,596$, $P > 0,0001$). Die 5-minütige Einführungszeit zeigt bei den weiblichen Tieren bis zum 3. Tag eine Zunahme der Trainingshäufigkeit (Tag 1 $1,4 \pm 0,5$, Tag 2 $6,5 \pm 1,5$, Tag 3 $9,0 \pm 3,0$, Tag 4 $6,3 \pm 1,7$). Ab dem vierten Tag nehmen die Häufigkeiten bei den Weibchen ebenfalls ab. Sie sind aber immer noch häufiger als während der 10-minütigen Einführungszeit (Tag 1 $0,4 \pm 0,2$, Tag 2 $1,4 \pm 0,3$, Tag 3 $1,8 \pm 0,5$, Tag 4 $2,8 \pm 0,7$).

Trainingshäufigkeit mit einer Einführungszeit von 5 Min. und 10 Min.

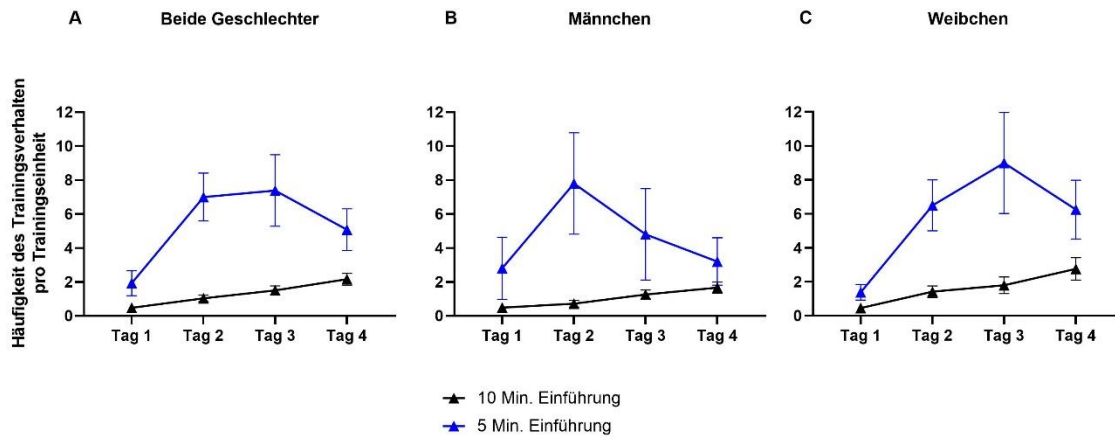


Abbildung 42: Häufigkeiten des Trainingsverhaltens der trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) mit einer Einführungszeit von 5 (blau) und 10 Minuten (schwarz). Es ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens beider Geschlechter (A) sowie die Häufigkeit aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) 5 Minuten (n=13), 10 Minuten (n=64). (B) 5 Minuten (n=5), 10 Minuten (n=35). (C) 5 Minuten (n=8), 10 Minuten (n=29). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.2.4 EINFLUSS DES KLICKERTRAININGS AUF DIE INTERAKTIONSZEIT MIT DEM EXPERIMENTATOR

In diesem Abschnitt wird das Wohlbefinden der Tiere anhand der Interaktion mit dem Experimentator evaluiert. Die Auswertungen der Interaktionszeit vor und nach dem Klickertraining sind in Abbildung 43 und Abbildung 44 dargestellt. Das Klickertraining der Mütter hat keinen Einfluss auf die Interaktion der Nachkommen mit dem Experimentator vor dem Training (M+ 4,0 Sek., M- 4,0 Sek.). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes (Abbildung 43 B und C) gibt es weder bei den männlichen ($P = 0,1934$, M- 2,4 Sek., M+ 3,7 Sek.) noch bei den weiblichen Nachkommen ($P = 0,1579$, M- 5,5 Sek., M+ 4,3 Sek.) einen signifikanten Unterschied (unpaired t - test,) vor dem Klickertraining.

Test auf Interaktion vor dem Training

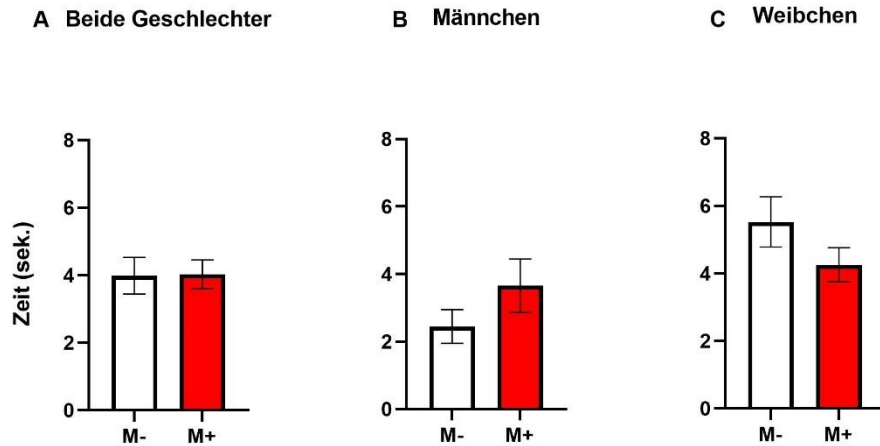


Abbildung 43: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator der Nachkommen von trainierten und nicht trainierten Müttern des Crl:CD1(ICR) Stammes vor dem Klickertraining. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). Es ist die Interaktion beider Geschlechter mit dem Experimentator **(A)** sowie die Interaktion aufgeteilt nach dem männlichen **(B)** und dem weiblichen Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M+ Gruppe (n=23), M- Gruppe (n=24). **(B)** M- Gruppe (n=9), M+ Gruppe (n=12). **(C)** M- Gruppe (n=14), M+ Gruppe (n=12). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Das Klickertraining der Nachkommen beeinflusst signifikant die Interaktionszeit mit dem Experimentator (2-way ANOVA, $F_{1,43} = 6,373$, $P = 0,0154$). Das Klickertraining der Mütter sowie die Interaktion haben keinen signifikanten Effekt auf die Interaktionszeit. Die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern interagieren länger mit dem Experimentator ($M+N+ 9,8 \pm 1,4$ Sek.) als trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern ($M-N+ 7,5 \pm 0,9$ Sek.), untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern ($M+N- 5,9 \pm 1,1$ Sek.) und untrainierte Nachkommen von untrainierten Müttern ($M-N- 6,0 \pm 0,8$ Sek.). Es konnte eine signifikant längere Interaktionszeit durch das Klickertraining der Nachkommen nachgewiesen werden. Die männlichen Tiere zeigen nach dem Klickertraining einen signifikanten Unterschied in der Interaktionszeit mit dem Experimentator, wenn zuvor die Mütter trainiert wurden. Das Klickertraining der Mütter steigert signifikant die Interaktionszeit mit dem Experimentator (2-way ANOVA zeigt einen signifikanten Effekt des Trainings der Mütter, $F_{1,17} = 5,088$, $P = 0,0376$, nicht aber im Faktor Klickertraining der Nachkommen, sowie Interaktion). Die Nachkommen, die von trainierten Müttern abstammen und selbst trainiert sind, zeigen die längste Interaktionszeit ($M+N+ 11,3 \pm 2,9$ Sek.), gefolgt von den untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern ($M+N- 8,6 \pm 1,4$ Sek.). Die kürzeste Interaktionszeit hatten die trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern ($M-N+ 6,8 \pm 1,1$ Sek.) sowie die untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern ($M-N- 5,4 \pm 1,1$ Sek.). Anders als die männlichen Tiere

zeigen die weiblichen Tiere eine signifikant längere Interaktionszeit, wenn die Nachkommen trainiert werden (2-way ANOVA zeigt einen signifikanten Effekt im Faktor Klickertraining der Nachkommen, $F_{1,22}=5,589$, $P = 0,0273$, aber nicht im Faktor Klickertraining der Mütter sowie in der Interaktion). Die längste Interaktionszeit zeigen die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N- $8,9 \pm 1,4$ Sek.) gefolgt von den trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+ $8,2 \pm 1,4$ Sek.). Nachkommen, die nicht trainiert wurden zeigen eine kürzere Interaktionszeit (M-N- $6,7 \pm 1,2$ Sek., M+N- $4,1 \pm 1,1$ Sek.).

Test auf Interaktion nach dem Training

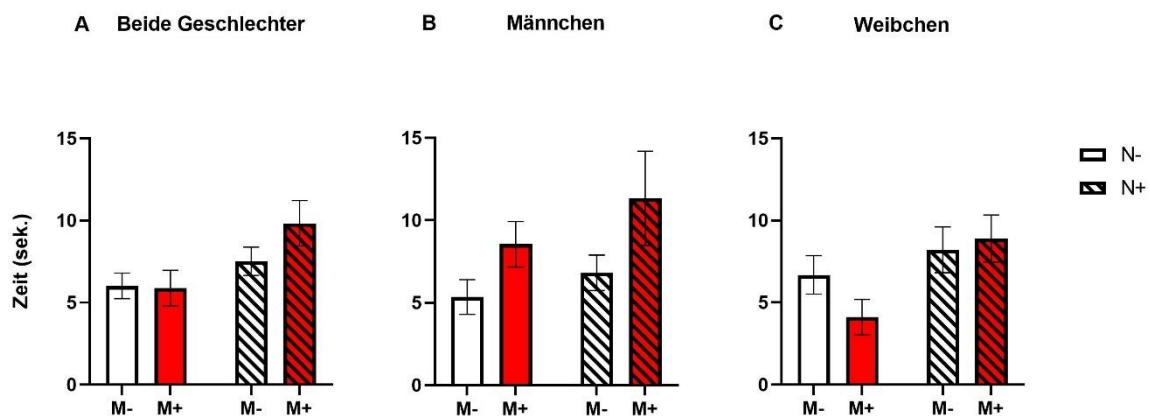


Abbildung 44: Ermittlung der Interaktionszeit der Nachkommen von trainierten und nicht trainierten Müttern des Cr1:CD1(ICR) Stammes nach dem Klickertraining. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). Es ist die Interaktionszeit beider Geschlechter mit dem Experimentator (A) sowie die Interaktionszeit aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=10), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=13). (B) M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=4), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=5). (C) M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=6), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=8). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.2.5 AUSWIRKUNG DES KLICKERTRAININGS AUF DAS ÄNGST-ASSOZIIERTE VERHALTEN DER NACHKOMMEN (EPM & OF)

Im folgenden Abschnitt wird das Angst-assoziierte Verhalten der Tiere evaluiert. Dafür wird die Dauer gemessen, die die Tiere in den offenen Armen des EPMS und im Zentrum des OFs verbringen. In Abbildung 45 ist die Aufenthaltsdauer der Nachkommen in den offenen Armen des EPMS dargestellt. Weder das Klickertraining der Mütter (Protokoll A) noch das Klickertraining der Nachkommen weist eine signifikant längere (2-way ANOVA) Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMS auf (M-N- $69,1 \pm 9,9$ Sek., M+N- $64,6 \pm 6,3$ Sek., M-N+ $62,9 \pm 4,1$ Sek., M+N+ $58,0 \pm 5,5$ Sek.). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes konnte weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Nachkommen (Abbildung 45 B/C),

eine signifikant längere Aufenthaltsdauer in den offenen Armen nachgewiesen werden. Ebenfalls gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen (Abbildung 46 A: M-N- 73,9 ± 11,8 Sek., M+N- 90,8 ± 9,6 Sek., M-N+ 73,0 ± 6,1 Sek., M+N+ 87,4 ± 6,8 Sek.), im Zentrum (Abbildung 46 B) (M-N- 156,9 ± 11,6 Sek., M+N- 144,4 ± 13,6 Sek., M-N+ 164,0 ± 7,0 Sek., M+N+ 154,5 ± 8,0 Sek.) sowie der zurückgelegten Gesamtlaufstrecke (M-N- 1134,4 ± 72,9 cm, M+N- 1170,8 ± 125,5 cm, M-N+ 1237,3 ± 75,6 cm, M+N+ 1207,8 ± 81,8 cm) (Abbildung 46 C).

**Auswirkung des Trainings der Nachkommen auf das erhöhte Pluslabyrinth (EPM)
- Aufenthaltsdauer in den offenen Armen -**

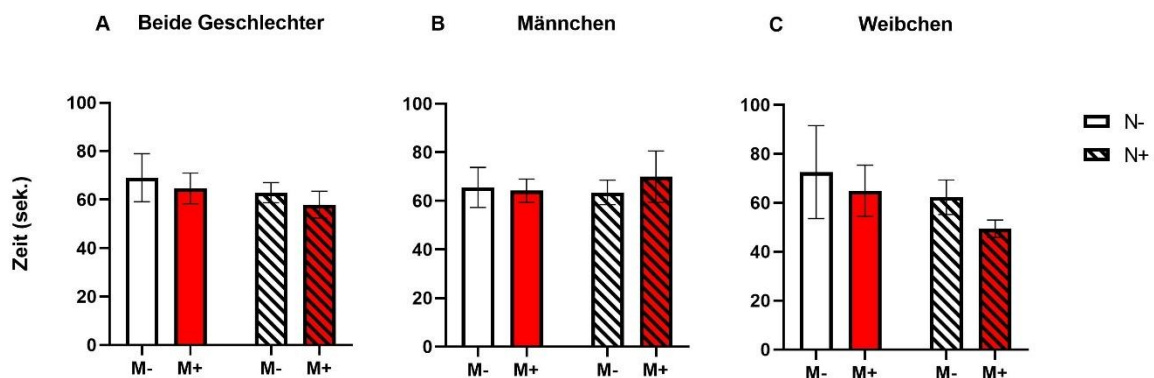


Abbildung 45: Aufenthaltsdauer in den offenen Armen vom EPM des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). Es ist die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen beider Geschlechter (A) sowie die Aufenthaltsdauer aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=10), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=12). (B) M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=4), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=5). (C) M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=6), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=7). Die Daten zeigen den Mittelwert ± SEM.

Auswirkung des Trainings der Nachkommen auf das erhöhte Pluslabyrinth (EPM)

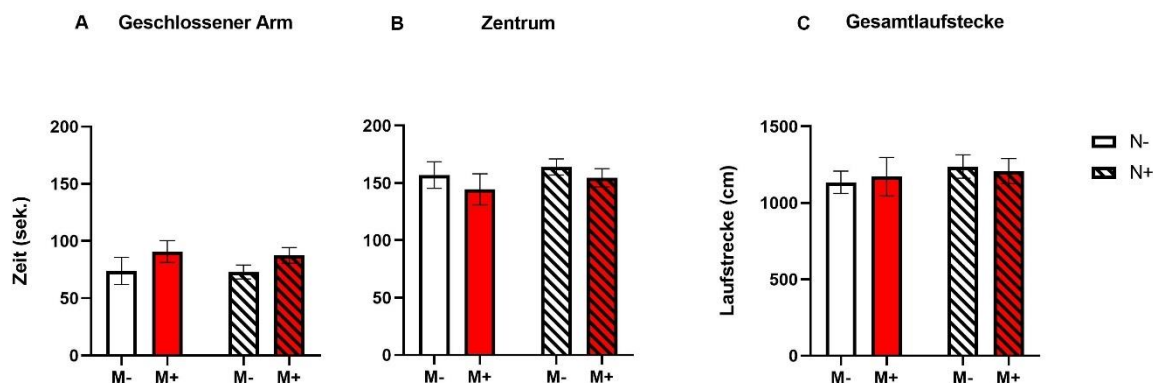


Abbildung 46: Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen (A), im Zentrum (B) sowie die Gesamtlaufstrecke (C) vom EPM des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). (A/B/C) M-N-Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=10), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=12). Die Daten zeigen den Mittelwert ± SEM.

In Abbildung 47 und Abbildung 48 ist die Auswertung des OF Tests (2-way ANOVA) dargestellt. Die Auswertung zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Aufenthaltsdauer weder im Zentrum (M-N- 33,8 ± 4,1 Sek., M+N- 27,5 ± 4,0 Sek., M-N+ 30,5 ± 3,3 Sek., M+N+ 26,2 ± 1,8 Sek.) noch in der Peripherie (M-N- 265,5 ± 4,1 Sek., M+N- 272,3 ± 3,9 Sek., M-N+ 269,3 ± 3,3 Sek., M+N+ 273,1 ± 1,8 Sek.). Es gibt allerdings einen signifikanten Unterschied in der Gesamtlaufstrecke durch den Einfluss des Trainings der Nachkommen (2-way ANOVA zeigt einen signifikanten Effekt des Faktors Klickertraining der Nachkommen, $F_{1,44}=4,485$, $P = 0,0399$). Die Nachkommen, welche trainiert wurden, legen signifikant eine längere Laufstrecke im OF zurück (M-N+ 3440,8 ± 187,3 cm, M+N+ 3785,0 ± 215,8 cm) als untrainierte Nachkommen (M-N- 3368,6 ± 116,3 cm, M+N- 3054,3 ± 216,6 cm). Wie zuvor bereits gezeigt, gibt es keinen Unterschied in der Aufenthaltsdauer im Zentrum. Diese Ergebnisse sind auch auf die Weibchen (M-N- 24,6 ± 3,5 Sek., M+N- 24,1 ± 5,1 Sek., M-N+ 23,5 ± 2,6 Sek., M+N+ 26,7 ± 2,6 Sek.) übertragbar jedoch nicht auf die Männchen (Abbildung 47 B/C). Die männlichen Tiere zeigen einen signifikanten Effekt im Klickertraining der Mütter (2-way ANOVA, $F_{1,17} = 5,438$, $P = 0,0323$) aber keinen Effekt auf den Faktor Klickertraining der Nachkommen sowie die Interaktion. Die Nachkommen von untrainierten Müttern verbringen signifikant mehr Zeit im Zentrum (M-N- 43,0 ± 5,1 Sek., M-N+ 37,6 ± 4,7 Sek.) als die Nachkommen von trainierten Müttern (M+N- 32,7 ± 6,1 Sek., M+N+ 25,5 ± 2,5 Sek.).

**Auswirkung des Trainings der Nachkommen auf den offenen Feld Test (OF)
- Aufenthaltsdauer im Zentrum -**

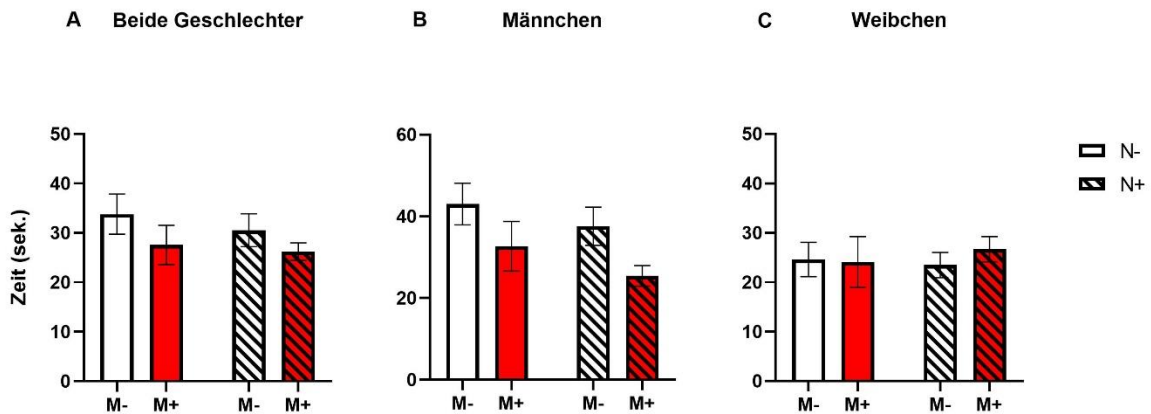


Abbildung 47: Aufenthaltsdauer im Zentrum des OF vom Crl:CD1(ICR) Stamm nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). Es ist die Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs beider Geschlechter **(A)** sowie die Aufenthaltsdauer aufgeteilt nach dem männlichen **(B)** und dem weiblichen Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=10), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=13). **(B)** M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=4), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=5). **(C)** M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=6), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=8). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Auswirkung des Trainings der Nachkommen auf den offenen Feld Test (OF)

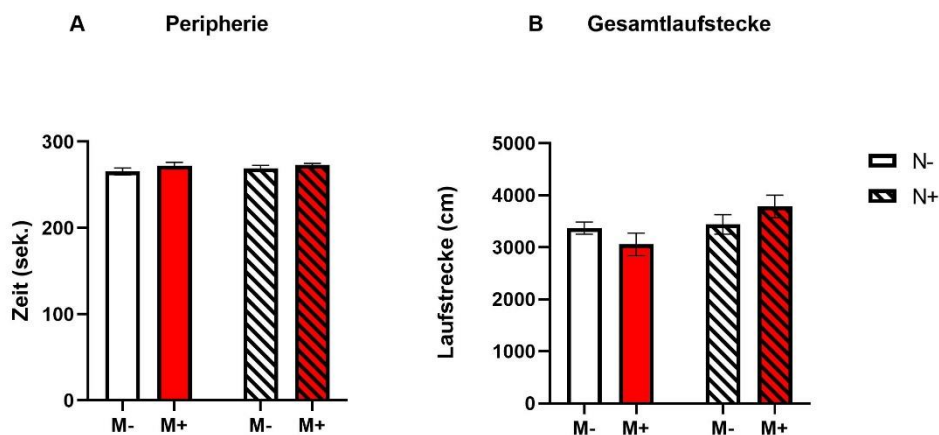


Abbildung 48: Aufenthaltsdauer in der Peripherie (A) sowie die Gesamtlaufstrecke (B) vom OF des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). (A/B) M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=10), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=13). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.2.6 NESTBAUVERHALTEN DER NACHKOMMEN

In diesem Abschnitt wird das Wohlbefinden der Tiere mittels Nestbauverhalten evaluiert. In Abbildung 49 ist die Auswertung (2-way ANOVA) des NBT dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Nestbau Score festgestellt werden. Das Klickertraining der Mütter und das Klickertraining der Nachkommen (M-N- $2,7 \pm 0,3$, M+N- $3,1 \pm 0,4$, M-N+ $2,4 \pm 0,2$, M+N+ $3,1 \pm 0,3$) haben keinen Einfluss auf das Nestbauverhalten. Unter Berücksichtigung des Geschlechtes gibt es ebenfalls keinen Unterschied im Nestbau Score. Weder das Klickertraining der männlichen Nachkommen (M-N- $2,5 \pm 0,2$, M+N- $2,3 \pm 0,3$, M-N+ $2,5 \pm 0,3$, M+N+ $3,3 \pm 0,4$) noch das Training der weiblichen Nachkommen (M-N- $2,9 \pm 0,5$, M+N- $3,7 \pm 0,6$, M-N+ $2,3 \pm 0,2$, M+N+ $2,9 \pm 0,4$) sowie das der Mütter zeigen einen Unterschied im Nestbau Score (Abbildung 49 B/C).

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen auf das Nestbauverhalten

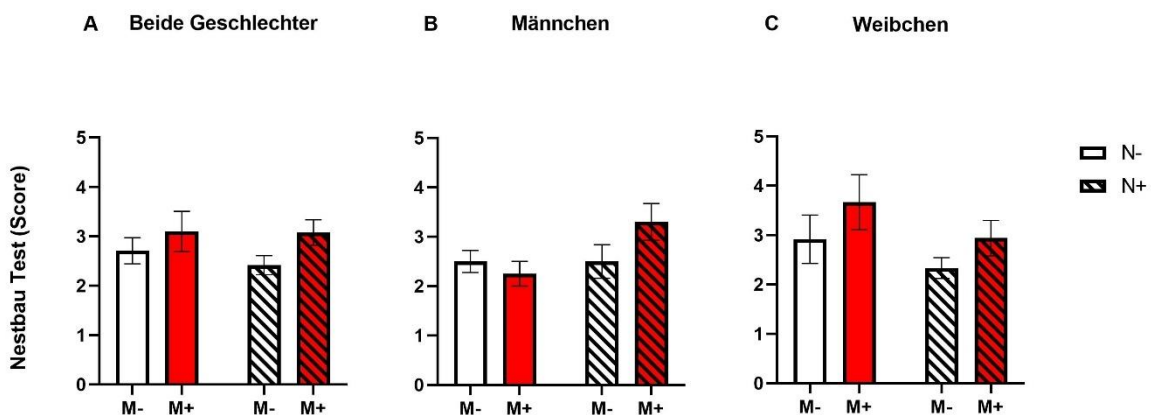


Abbildung 49: Nestbautest (Score) des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). Es ist das Nestbauverhalten beider Geschlechter **(A)** sowie das Verhalten aufgeteilt nach dem männlichen **(B)** und dem weiblichen Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=10), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=13). **(B)** M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=4), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=5). **(C)** M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=6), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=8). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.2.7 AUSWIRKUNG DES KLICKERTRAININGS AUF DAS DEPRESSIONS-ASSOZIIERTE VERHALTEN DER NACHKOMMEN (SPT & FST)

Im folgenden Abschnitt wird das Depressions-assoziierte Verhalten der Tiere anhand der Aufnahme von Saccharose und der Immobilität evaluiert. In Abbildung 50 ist die Auswertung

(2-way ANOVA) des SPTs dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Saccharose Präferenz zwischen dem Klickertraining der Mütter und dem Klickertraining der Nachkommen (M-N- $77,3 \pm 7,8$ %, M+N- $71,1 \pm 8,2$ %, M-N+ $60,2 \pm 11,2$ %, M+N+ $76,6 \pm 5,7$ %) nachgewiesen. Unter Berücksichtigung des Geschlechtes konnte ebenfalls kein Unterschied in der Saccharose Präferenz nachgewiesen werden. Weder das Klickertraining der männlichen (M-N- $78,5 \pm 12,3$ %, M+N- $55,0 \pm 11,6$ %, M-N+ $58,3 \pm 16,4$ %, M+N+ $81,7 \pm 4,9$ %) noch das Klickertraining der weiblichen Nachkommen (M-N- $76,2 \pm 10,7$ %, M+N- $81,7 \pm 9,5$ %, M-N+ $62,2 \pm 16,7$ %, M+N+ $73,3 \pm 8,9$ %) noch deren Mütter zeigen eine signifikante höhere Saccharose Präferenz.

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen auf die Saccharose Präferenz

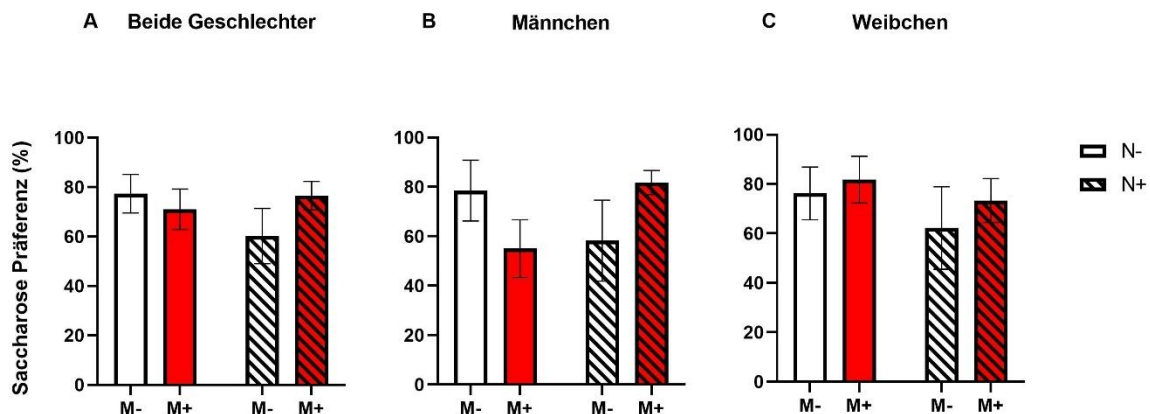


Abbildung 50: Saccharose Präferenz in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). Es ist die Saccharose Präferenz beider Geschlechter (A) sowie die Präferenz aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=10), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=13). (B) M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=4), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=5). (C) M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=6), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=8). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

In Abbildung 51 ist die Auswertung (2-way ANOVA) des FSTs dargestellt. Sie zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Immobilitätsdauer zwischen dem Klickertraining der Mütter und dem Klickertraining der Nachkommen (M-N- $7,4 \pm 3,4$ %, M+N- $1,6 \pm 1,3$ %, M-N+ $2,9 \pm 1,6$ %, M+N+ $1,8 \pm 0,7$ %). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes konnte kein Unterschied in der Immobilitätsdauer nachgewiesen werden. Weder das Klickertraining der männlichen (M-N- $3,4 \pm 3,1$ %, M+N- $0,4 \pm 0,3$ %, M-N+ $2,2 \pm 1,6$ %, M+N+ $1,5 \pm 0,9$ %) noch das Klickertraining der weiblichen Nachkommen (M-N- $10,1 \pm 5,3$ %, M+N- $2,6 \pm 2,3$ %, M-N+ $4,0 \pm 4,0$ %, M+N+ $1,9 \pm 1,0$ %) sowie deren Mütter, zeigen eine signifikante kürzerer Immobilitätsdauer (Abbildung 51 B/C). Ein Abbruch des Versuches erfolgt nach einer Immobilitätsphase von max. 30 Sekunden. Daher sind in der Auswertung weniger Tiere

berücksichtigt. Insgesamt wurden 8 Tiere abgebrochen darunter vier männliche und vier weibliche Tiere (Männchen: M-N- n=2, M-N+ n= 1, M+N+ n=1; Weibchen: M-N+ n= 3, M+N+ n=1).

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen auf den Schwimmtest (FST)

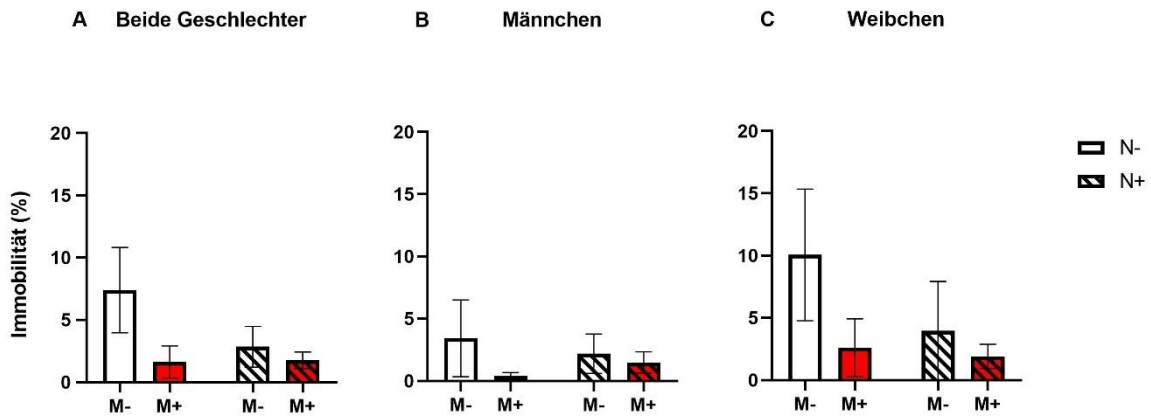


Abbildung 51: Messung der Immobilität bei 1,5 % der Aktivitätsrate in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). Es ist die Immobilitätsdauer beider Geschlechter (A) sowie die Dauer aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N- Gruppe (n=10), M+N- Gruppe (n=9), M-N+ Gruppe (n=8), M+N+ Gruppe (n=11). (B) M-N- Gruppe (n=4), M+N- Gruppe (n=4), M-N+ Gruppe (n=5), M+N+ Gruppe (n=4). (C) M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=5), M-N+ Gruppe (n=3), M+N+ Gruppe (n=7). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.2.8 CORTICOSTERONBESTIMMUNG DER NACHKOMMEN

Die Auswertung (2-way ANOVA) der Corticosteronbestimmung soll das Stresslevel der Tiere evaluieren, um dann Rückschlüsse auf deren Wohlbefinden schließen zu können. Direkt nach dem FST wurden die Blutproben gesammelt. Die Ergebnisse der Bestimmung des Corticosterons im Blutplasma sind in Abbildung 52 dargestellt. Es gibt eine signifikante höhere Corticosteronkonzentration im Blutplasma durch das Klickertraining der Mütter ($F_{1,32}=10,21$, $P = 0,0031$) nicht aber im Klickertraining der Nachkommen sowie in der Interaktion. Die Nachkommen von trainierten Müttern weisen eine signifikant höhere Corticosteronkonzentration im Blutplasma auf (M+N- $4648,3 \pm 556,0$ pg/mL, M+N+ $5013,3 \pm 1119,2$ pg/mL) als die Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N- $2044,1 \pm 327,3$ pg/mL, M-N+ $2869,2 \pm 815,6$ pg/mL). Die signifikant höhere Corticosteronkonzentration lässt sich auch bei den weiblichen Nachkommen im Klickertraining der Mütter ($F_{1,15}=12,66$, $P = 0,0029$) und im Klickertraining der Nachkommen ($F_{1,15}=5,885$, $P = 0,0283$) jedoch nicht in der Interaktion nachweisen. Das Klickertraining der Mütter (M+N- $5885,6 \pm 209,3$ pg/mL, M+N+

6854,7 ± 970,5 pg/mL) sowie das Klickertraining der Nachkommen (M-N+ 5014,5 ± 530,0 pg/mL) weist eine höhere Corticosteronkonzentration im Blutplasma der weiblichen Tiere auf als die Tiere, die kein Klickertraining erhalten haben (M-N- 2248,1 ± 792,8 pg/mL). Bei den männlichen Tieren (Abbildung 52 B) lässt sich eine signifikant geringere Corticosteronkonzentration ($F_{1,13} = 6,918$, $P = 0,0208$) im Klickertraining der Nachkommen (M-N- 1908,1 ± 246,3 pg/mL, M+N- 2792,3 ± 246,3 pg/mL, M-N+ 1260,3 ± 417,9 pg/mL, M+N+ 1330,7 ± 387,6 pg/mL) nicht aber im Klickertraining der Mütter sowie in der Interaktion nachweisen.

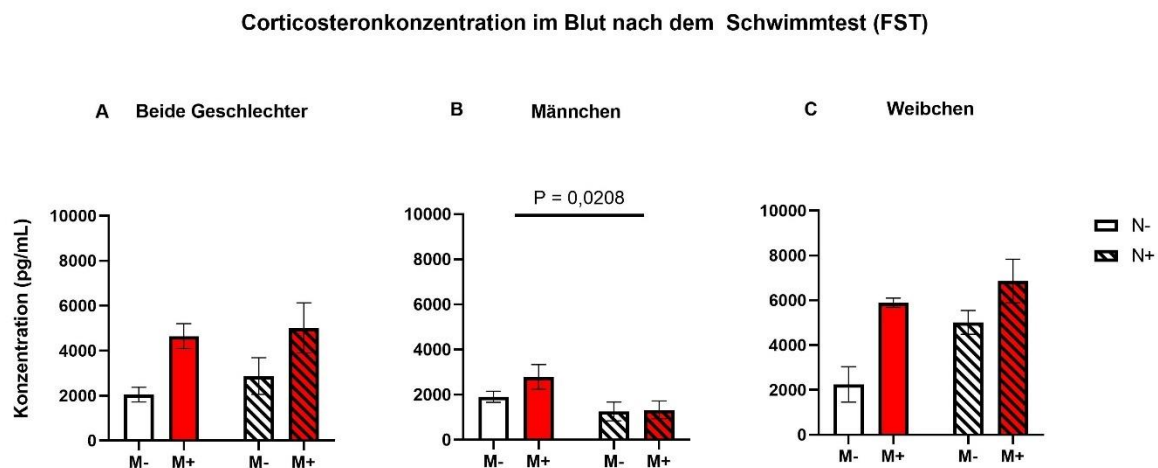


Abbildung 52: Corticosteronbestimmung mittels ELISA des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll A). Es ist die Plasmacorticosteronkonzentration beider Geschlechter (A) sowie die Konzentration aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N-Gruppe (n=10), M+N- Gruppe (n=10), M-N+ Gruppe (n=7), M+N+ Gruppe (n=9). (B) M-N-Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=4), M-N+ Gruppe (n=4), M+N+ Gruppe (n=3). (C) M-N- Gruppe (n=4), M+N- Gruppe (n=3), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). Die Daten zeigen den Mittelwert ± SEM.

Unter Berücksichtigung aller Verhaltenstests sowie der Corticosteronbestimmungen konnten diverse Auswirkungen des Klickertrainings nachgewiesen werden. Alle trainierten Nachkommen (Beide Geschlechter) nehmen signifikant mehr an Gewicht zu als die untrainierten Nachkommen. Die Erfolge des Klickertrainings bei den trainierten Nachkommen nehmen signifikant mit der Anzahl der Trainingstage zu, sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Nachkommen. Zusätzlich wurde bei der verkürzten Einführungszeit von 5 Minuten eine signifikante Verbesserung der erlernten Trainingshäufigkeiten pro Tag nachgewiesen. Diese ist signifikant größer als die Trainingshäufigkeiten einer 10-minütigen Einführungszeit. Der Test auf Interaktion hat gezeigt, dass das Klickertraining der Nachkommen die Interaktion mit dem Experimentator erhöht. Das Klickertraining der Mütter führt bei männlichen Nachkommen zu einer signifikant längeren Interaktionszeit. Bei den

weiblichen Nachkommen führt das Klickertraining der Nachkommen zu einer signifikant längeren Interaktionsdauer. Die Auswertung des Angst-assoziierten Verhaltens der Tiere zeigt keinen Unterschied in der Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMS und im Zentrum des OFs. Wohingegen die zurückgelegte Laufstrecke im OF bei den trainierten Nachkommen signifikant länger ist. Bei den männlichen Tieren zeigt sich zusätzlich noch eine signifikante kürzere Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs durch das Klickertraining der Mütter. Das Klickertraining zeigt keinen Einfluss auf die Untersuchungen des SPT, NBT und FST. Das Klickertraining der Mütter hat eine signifikant höheren Corticosteronkonzentration zur Folge als das Klickertraining der Nachkommen. Diese signifikant höhere Corticosteronkonzentration durch das Klickertraining der Mütter lässt sich auch bei den weiblichen Nachkommen von trainierten Müttern nachweisen. Bei den männlichen Nachkommen zeigt sich eine signifikant geringere Corticosteronkonzentration durch das Klickertraining der Nachkommen.

4.3 DRITTER VERSUCHSTEIL: 5 MINUTEN KLICKEREINFÜHRUNG MIT ZWEI TRAININGSEINHEITEN DER MÜTTER (PROTOKOLL B) DES AUSZUCHTSTAMMES CRL:CD1(ICR)

In dem dritten Versuchsteil soll nachgewiesen werden, ob eine zusätzliche Trainingswiederholung der Mütter nach der Geburt der Nachkommen an P14 das Wohlbefinden weiter verbessert und das Angst- und Depressions-assoziierte Verhalten minimiert. Um festzustellen, ob die Wiederholung des Trainings der Mütter die gewünschten Ergebnisse erzielt, werden die Häufigkeiten des Trainingsverhaltens der Mütter, die einmal trainiert wurden (Protokoll A) mit den Häufigkeiten des Trainingsverhaltens von Müttern verglichen, die zweimal trainiert wurden (Protokoll B). Für diese Untersuchungen bleibt die Klickereinführung bei einer Dauer von 5 Minuten.

4.3.1 GEWICHTSZUNAHME DER NACHKOMMEN WÄHREND DES KLICKERTRAININGS

In diesem Abschnitt soll das Körpergewicht zur Bestimmung des Wohlbefindens der Tiere evaluiert werden. Das Gewicht der verschiedenen Gruppen wurde vor und nach dem Klickertraining ermittelt. In Abbildung 53 ist die Gewichtszunahme in Prozent dargestellt. Alle Tiere (Beide Geschlechter) nehmen während des Klickertrainings an Gewicht zu (M-N- $3,4 \pm 1,2$ %, M+N- $3,5 \pm 1,2$ %, M-N+ $5,4 \pm 2,7$ % M+N+ $4,3 \pm 1,4$ %). Die Zunahme ist jedoch nicht signifikant (2-way ANOVA zeigt keine Signifikanzen weder nach dem Klickertraining der Nachkommen noch nach dem Klickertraining der Mütter sowie in der Interaktion). Unter

Berücksichtigung des Geschlechtes können Unterschiede in der Gewichtszunahme während des Klickertrainings bei den männlichen Nachkommen nachgewiesen werden. Alle männlichen Nachkommen (Abbildung 53 B) nehmen an Gewicht zu (M-N- $4,5 \pm 1,1$ %, M+N- $5,8 \pm 0,5$ %, M-N+ $7,3 \pm 0,5$ %, M+N+ $7,1 \pm 0,9$ %). Das Klickertraining der Nachkommen führt zu einer signifikanten Gewichtszunahme im Vergleich zu dem Training der Mütter (2-way ANOVA zeigt eine signifikante Gewichtszunahme bei trainierten Nachkommen, $F_{1,16} = 5,682$, $P = 0,0299$, keine signifikante Zunahme des Gewichtes nach dem Training der Mütter und keine Signifikanz in der Interaktion). Das Klickertraining der Nachkommen (Abbildung 53 C), wie auch das der Mütter hat keinen signifikanten Effekt (2-way ANOVA) auf die Gewichtszunahme der weiblichen Nachkommen. Es nehmen aber alle weiblichen Tiere an Gewicht zu (M-N- $2,7 \pm 2,0$ %, M+N- $2,7 \pm 1,5$ %, M-N+ $3,4 \pm 5,6$ %, M+N+ $1,5 \pm 2,0$ %).

Gewichtszunahme während des Trainings

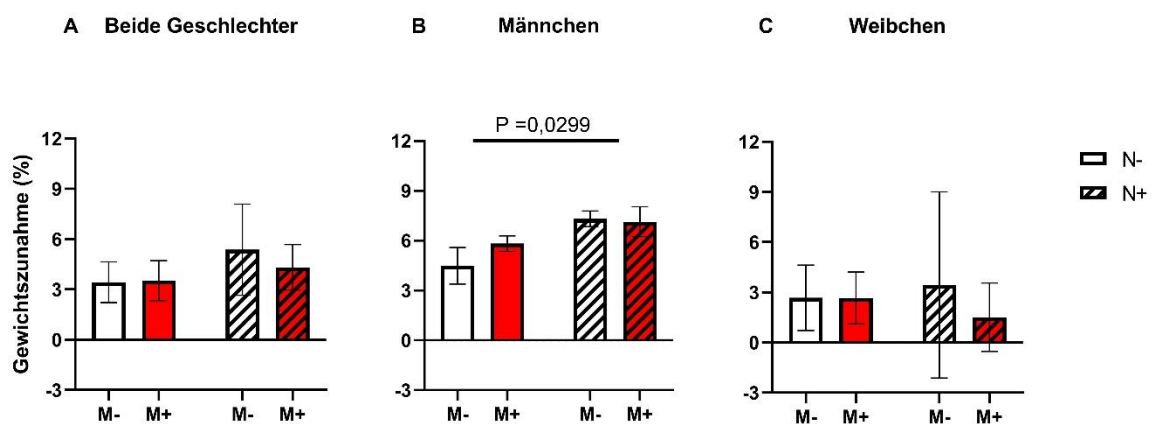


Abbildung 53: Gewichtszunahme der Nachkommen in Prozent nach mehrmaligem Klickertraining der Mütter (Protokoll B, 5 Minuten). Es ist die Gewichtszunahme beider Geschlechter (A) sowie die Zunahme aufgeteilt nach männlichem (B) und nach weiblichem Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=11), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=13). (B) M-N- Gruppe (n=5), M+N- Gruppe (n=3), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). (C) M-N- Gruppe (n=7), M+N- Gruppe (n=8), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.3.2 TRAININGSERFOLGE DER NACHKOMMEN

In diesem Abschnitt wird der Erfolg des Klickertrainings anhand der Häufigkeit der Wiederholung evaluiert. In Abbildung 54 ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens der Tiere pro Tag dargestellt. Beide Geschlechter zusammen (Abbildung 54 A) zeigen keine signifikante Zunahme der Trainingserfolge (2-way ANOVA, repeated measurements). Eine zusätzliche

Trainingswiederholung der Mütter hat keinen Einfluss auf die Häufigkeit der Trainingserfolge der Nachkommen. Alle Nachkommen können ihre Anzahl an Trainingserfolgen pro Tag verbessern (M-N+ Tag 1: $1,2 \pm 0,4$, Tag 2: $1,5 \pm 0,6$, Tag 3 $2,1 \pm 1,1$, Tag 4: $2,5 \pm 1,7$) (M+N+ Tag 1: $1,6 \pm 0,5$, Tag 2: $4,4 \pm 1,3$, Tag 3: $3,2 \pm 1,3$, Tag 4: $3,6 \pm 1,3$). Es zeigt sich lediglich eine Tendenz, dass ein zusätzliches Klickertraining der Mütter die Trainingshäufigkeit verbessert. Unter Berücksichtigung des Geschlechtes (Abbildung 54 B/C) kann keine signifikante Zunahme der Trainingshäufigkeiten nachgewiesen werden. Weder die männlichen (M-N+ Tag 1: $0,5 \pm 0,2$, Tag 2: $1,8 \pm 1,0$, Tag 3: $3,5 \pm 2,1$, Tag 4: $4,7 \pm 3,3$, M+N+ Tag 1: $2,2 \pm 0,7$, Tag 2: $6,0 \pm 1,7$, Tag 3: $4,7 \pm 2,2$, Tag 4: $5,0 \pm 1,9$) noch die weiblichen Nachkommen (M-N+ Tag 1: $1,8 \pm 0,7$, Tag 2: $1,2 \pm 0,7$, Tag 3: $0,7 \pm 0,5$, Tag 4: $0,3 \pm 0,3$, M+N+ Tag 1: $1,0 \pm 0,8$, Tag 2: $2,8 \pm 1,8$, Tag 3: $1,7 \pm 1,1$, Tag 4: $2,2 \pm 1,6$) zeigen einen Unterschied in der Trainingshäufigkeit. Die männlichen Tiere verbessern ihre Häufigkeit des Trainingsverhaltens mit jedem Tag jedoch ist diese Verbesserung nicht signifikant. Die weiblichen Tiere verschlechtern ihre Häufigkeit des Trainingsverhaltens, welche ebenfalls nicht signifikant ist.

Klickertraining der Nachkommen (Protokoll B)

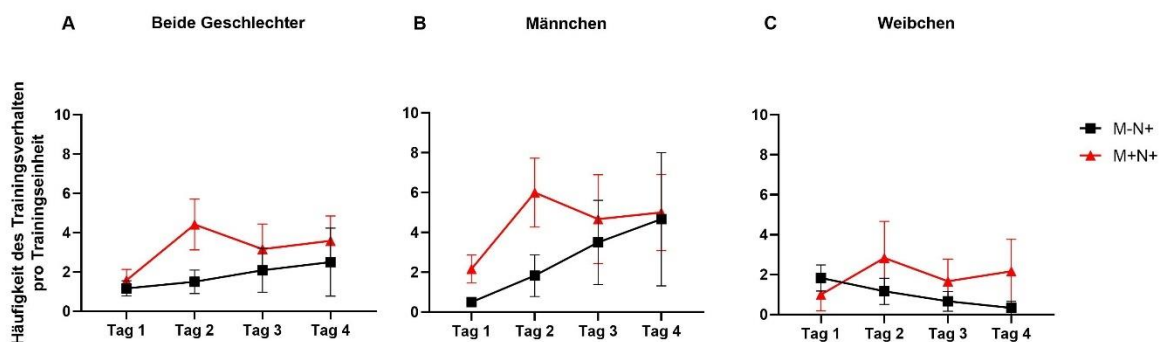


Abbildung 54: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten Crl:CD1(ICR) Nachkommen. Das Klickertraining der Mütter wurde zweimal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Es ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens beider Geschlechter (A) sowie die Häufigkeit aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=12). (B) M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). (C) M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.3.3 VERGLEICH DER TRAININGSERFOLGE DER NACHKOMMEN VON EINMAL TRAINIERTEN MÜTTERN (PROTOKOLL A) UND ZWEIMAL TRAINIERTEN MÜTTERN (PROTOKOLL B)

In diesem Abschnitt werden die Trainingserfolge der Nachkommen von einmal (Protokoll A) und zweimal (Protokoll B) trainierten Müttern verglichen. Abbildung 55 A zeigt die Häufigkeit der Trainingserfolge beider Geschlechter von Protokoll A mit B. Die trainierten Nachkommen

zeigen eine signifikante Zunahme der Häufigkeit der Trainingserfolge pro Tag (2-way ANOVA, $F_{2,2, 51,1} = 8,4$, $P = 0,0005$). Bei Trainingsprotokoll A zeigt sich eine signifikant höhere Häufigkeit der Trainingserfolge vom ersten auf den zweiten Trainingstag (2-way ANOVA, multiple comparisons, $P = 0,0006$, Tag 1 $1,9 \pm 0,7$, Tag 2 $7,0 \pm 1,4$, Tag 3 $7,4 \pm 2,1$, Tag 4 $5,1 \pm 1,2$). An Tag drei und vier nimmt die Häufigkeit ab. Sie bleibt jedoch immer noch höher als die Häufigkeiten trainierter Nachkommen, deren Mütter zweimal trainiert wurden (Protokoll B). In Trainingsprotokoll B konnten keine signifikanten Steigerungen der Trainingshäufigkeiten festgestellt werden (Tag 1 $1,6 \pm 0,5$, Tag 2 $4,4 \pm 1,3$, Tag 3 $3,1 \pm 1,3$, Tag 4 $3,6 \pm 1,3$). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes gibt es keine signifikanten Unterschiede, ob die Mütter der Nachkommen einmal oder zweimal trainiert wurden. Die männlichen Nachkommen können ihre Trainingshäufigkeit von Tag eins auf Tag zwei verbessern (Protokoll A: Tag 1 $2,8 \pm 1,8$, Tag 2 $7,8 \pm 3,0$ / Protokoll B: Tag 1 $2,2 \pm 0,7$, Tag 2 $6,0 \pm 1,7$). Ab dem dritten Trainingstag jedoch sinkt die Trainingshäufigkeit (Protokoll A: Tag 3 $4,8 \pm 2,7$, Tag 4 $3,2 \pm 1,4$) außer bei den Nachkommen, dessen Mütter zwei Mal trainiert wurden. Da steigt die Häufigkeit wieder leicht an (Protokoll B: Tag 3 $4,7 \pm 2,2$, Tag 4 $5,0 \pm 1,9$). Es konnte jedoch kein Unterschied in der Häufigkeit der Trainingserfolge bei den männlichen Nachkommen nachgewiesen werden. Unabhängig davon, ob die Mütter zuvor einmal oder zweimal trainiert wurden. Allerdings nimmt die Häufigkeit der Trainingserfolge mit den Tagen bei allen männlichen Nachkommen (Protokoll A und B) signifikant zu (2-way ANOVA, repeated measurements, $F_{2,4, 21,2} = 5,4$, $P = 0,0095$). Bei den weiblichen Nachkommen, dessen Mütter einmal trainiert wurden, konnte ein Anstieg der Häufigkeiten bis hin zum dritten Tag nachgewiesen werden (Protokoll A: Tag 1 $1,3 \pm 0,5$, Tag 2 $6,5 \pm 1,5$, Tag 3 $9,0 \pm 3,0$). Ab dem vierten Tag zeigt sich eine leichte Abnahme in der Häufigkeit der Trainingserfolge (Protokoll A: Tag 4 $6,3 \pm 1,7$). Diese ist jedoch immer noch größer als bei den zweifach trainierten Müttern (Protokoll B: Tag 1 $1,0 \pm 0,8$, Tag 2 $2,8 \pm 1,8$, Tag 3 $1,7 \pm 1,1$, Tag 4 $2,2 \pm 1,6$). Die Trainingserfolge der weiblichen Nachkommen nahmen ebenfalls signifikant mit den Trainingstagen zu (2-way ANOVA, repeated measurements, $F_{1,9,22,8} = 4,4$, $P = 0,0258$). Es wurde weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Nachkommen ein signifikanter Unterschied in der Trainingshäufigkeit zwischen einem einmaligen (Protokoll A) oder einem zweifachen Klickertraining (Protokoll B) der Mütter nachgewiesen.

Häufigkeiten der Trainingserfolge der Nachkommen von Müttern,
die einmal (Protokoll A) bzw. zweimal (Protokoll B) trainiert wurden

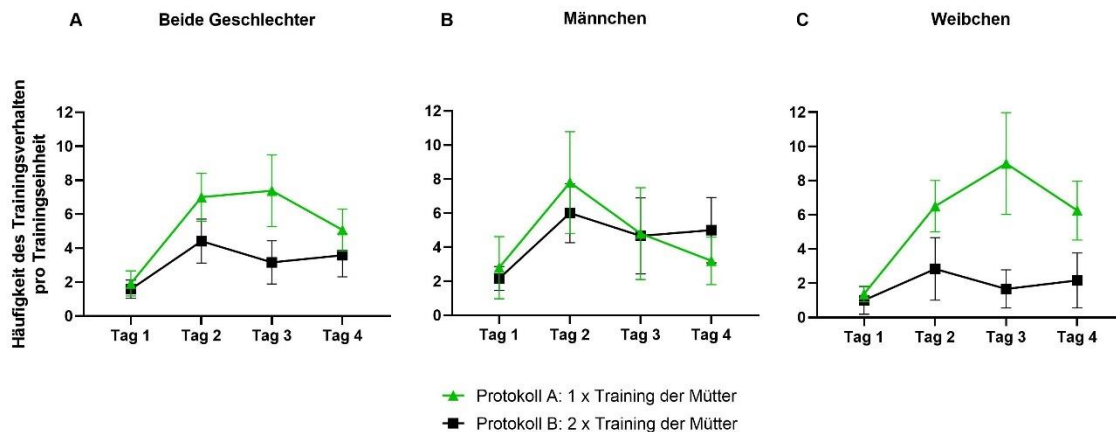


Abbildung 55: Vergleich der Trainingserfolge anhand trainierter Nachkommen von einmal trainierten Müttern (Protokoll A, grün) mit denen von zweimal trainierten Müttern (Protokoll B, schwarz) des CrI:ICR(CD1) Stammes. In Protokoll A wurden die Mütter nur einmal vor der Verpaarung trainiert. In Protokoll B wurden die Mütter vor der Verpaarung und 14 Tage nach der Geburt der Nachkommen trainiert. Es ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens aller Nachkommen (M+N+) (**A**) sowie die Häufigkeit aufgeteilt nach dem männlichen (**B**) und dem weiblichen Geschlecht (**C**) dargestellt. (**A**) Protokoll A (n=13), Protokoll B (n=12). (**B**) Protokoll A (n=5), Protokoll B (n=6). (**C**) Protokoll A (n=8), Protokoll B (n=6). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.3.4 EINFLUSS DES KLICKERTRAININGS AUF DIE INTERAKTIONSZEIT MIT DEM EXPERIMENTATOR

In diesem Abschnitt wird das Wohlbefinden der Tiere anhand der Interaktion mit dem Experimentator evaluiert. In Abbildung 56 und Abbildung 57 ist die Auswertung der Interaktionszeit mit dem Experimentator dargestellt. Bei allen Tieren (Beide Geschlechter) gibt es vor dem Klickertraining keinen Unterschied in der Dauer der Interaktionszeit, ob die Mütter zuvor einmal oder zweimal trainiert wurden (M- $4,0 \pm 0,7$ Sek., M+ $4,9 \pm 0,7$ Sek.). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes (Abbildung 56 B/C) kann ein signifikanter Unterschied (unpaired t-test, $F_{8,10} = 4,086$, $P = 0,0092$) in der Interaktionszeit mit dem Experimentator nur bei den männlichen (M- $2,0 \pm 0,3$ Sek., M+ $4,1 \pm 0,7$ Sek.) nicht aber bei den weiblichen Nachkommen (M- $5,6 \pm 1,0$ Sek., M+ $5,5 \pm 1,0$ Sek.) nachgewiesen werden.

Test auf Interaktion vor dem Training

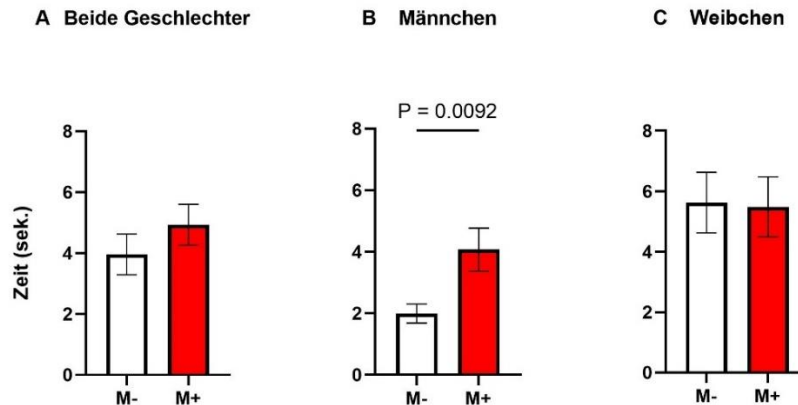


Abbildung 56: Ermittlung der Interaktionszeit der Nachkommen von trainierten und nicht trainierten Müttern des Crl:CD1(ICR) Stammes vor dem Klickertraining. Die Mütter wurden zweimal trainiert mit einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Es ist die Interaktion aller Tiere mit dem Experimentator (A) sowie die Interaktion aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M+ Gruppe (n=23), M- Gruppe (n=24). (B) M- Gruppe (n=9), M+ Gruppe (n=11). (C) M- Gruppe (n=14), M+ Gruppe (n=13). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Nach dem Klickertraining (M-N- $7,2 \pm 1,5$ Sek., M+N- $94,2 \pm 0,5$ Sek., M-N+ $5,5 \pm 0,6$ Sek., M+N+ $17,6 \pm 2,6$ Sek.) konnte gezeigt werden, dass alle beiden Geschlechter länger mit dem Experimentator interagieren als vor dem Klickertraining (Abbildung 57 A). Die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern interagieren signifikant am längsten von allen drei Gruppen. Eine signifikant (2-way ANOVA) längere Interaktionszeit konnte durch das Klickertraining der Mütter ($F_{1,43} = 8,203$, $P = 0,0064$), das Klickertraining der Nachkommen ($F_{1,43} = 13,75$, $P = 0,0006$) und ihre Interaktion ($F_{1,43} = 22,37$, $P < 0,0001$) nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung des Geschlechtes kann die signifikant längere Interaktionszeit auch bei den männlichen Tieren festgestellt werden. Die Auswertung (2-way ANOVA) deutet auf eine signifikant längere Interaktionszeit durch das Klickertraining der Mütter ($F_{1,16} = 6,976$, $P = 0,00178$), durch das Klickertraining der Nachkommen ($F_{1,16} = 13,52$, $P = 0,0020$) und durch die Interaktion ($F_{1,16} = 6,713$, $P = 0,0197$) hin. Die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern interagieren im Mittel $19,9 \pm 4,0$ Sekunden mit dem Experimentator. Die trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern interagieren im Mittel $6,0 \pm 1,0$ Sekunden. Untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern interagieren im Mittel $3,3 \pm 1,3$ Sekunden und untrainierte Nachkommen von untrainierten Müttern interagieren im Mittel $3,2 \pm 0,8$ Sekunden mit dem Experimentator. Bei den weiblichen Tieren ist dieser Effekt nur in der Interaktion nachweisbar (2-way ANOVA, Interaktion $F_{1,23} = 17,27$, $P = 0,0004$). Die trainierten, weiblichen Nachkommen von trainierten Müttern interagieren ebenfalls am längsten. Im Mittel betrug die

Interaktionszeit $15,3 \pm 3,6$ Sekunden mit dem Experimentator (M-N+ $5,0 \pm 0,9$ Sek., M+N- $4,5 \pm 0,5$ Sek., M-N- $10,0 \pm 1,8$ Sek.).

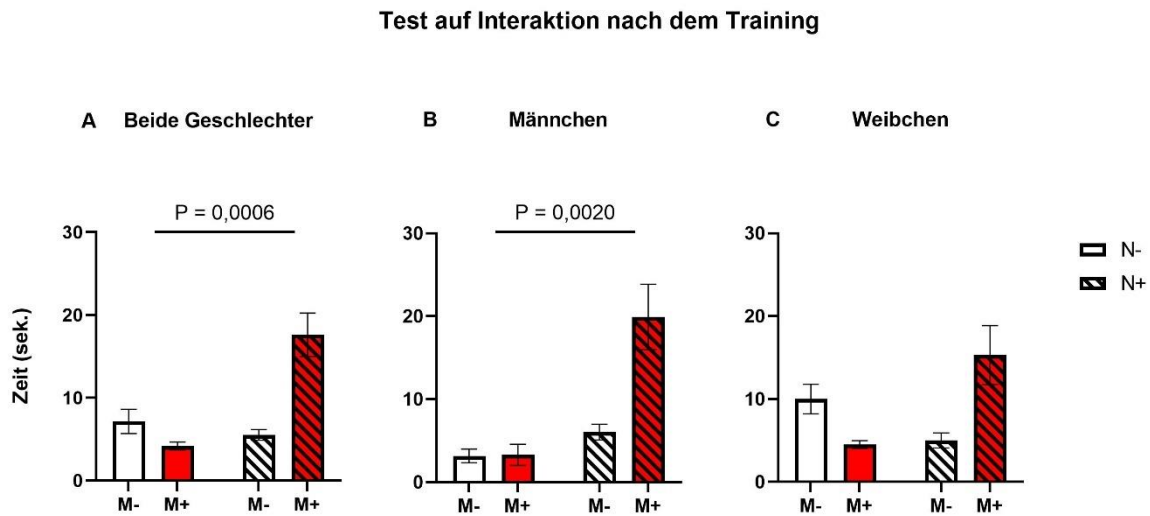


Abbildung 57: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator der Nachkommen von trainierten und nicht trainierten Müttern des Cr1:CD1(ICR) Stammes nach dem Klickertraining. Die Mütter wurden zweimal trainiert mit einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Es ist die Interaktionszeit beider Geschlechter mit dem Experimentator (A) sowie die Interaktionszeit aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=11), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=12). (B) M-N- Gruppe (n=5), M+N- Gruppe (n=3), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). (C) M-N- Gruppe (n=7), M+N- Gruppe (n=8), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.3.5 AUSWIRKUNG DES KLICKERTRAININGS AUF DAS ANGST-ASSOZIIERTE VERHALTEN DER NACHKOMMEN (EPM & OF)

Im folgenden Abschnitt wird das Angst-assoziierte Verhalten der Tiere anhand der Dauer, die die Tiere in den offenen Armen des EPMS und im Zentrum des OFs verbringen, evaluiert. In Abbildung 58 ist die Auswertung des EPMS dargestellt. Nach einer Trainingswiederholung der Mütter (Protokoll B) sowie dem Klickertraining der Nachkommen, gibt es keinen signifikanten Unterschied (2-way ANOVA) in der Aufenthaltsdauer der einzelnen Gruppen in den offenen Armen des EPMS (M-N- $56,1 \pm 4,5$ Sek., M+N- $52,1 \pm 8,7$ Sek., M-N+ $51,4 \pm 6,2$ Sek., M+N+ $41,1 \pm 4,9$ Sek.). Weder das Klickertraining der Mütter noch das Training der Nachkommen bewirkt eine längere Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMS (2-way ANOVA zeigt keinen signifikanten Effekt des Klickertrainings der Mütter, keinen signifikanten Effekt im Klickertraining der Nachkommen und keinen signifikanten Effekt in der Interaktion). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes lässt sich dieses Ergebnis (2-way ANOVA) auf die weiblichen Nachkommen übertragen. Das Klickertraining der Mütter zeigt keine signifikant längere Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMS im Klickertraining der weiblichen

Nachkommen sowie in der Interaktion (M-N- 61,2 ± 6,9 Sek., M+N- 49,6 ± 9,7 Sek., M-N+ 66,5 ± 6,8 Sek., M+N+ 47,7 ± 8,8 Sek.). Das Klickertraining der männlichen Nachkommen (Abbildung 58 B) hingegen verkürzt signifikant die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMs ($F_{1,16} = 5,686$, $P = 0,0298$). Das Klickertraining der Mütter sowie die Interaktion haben keinen signifikanten Einfluss auf die Aufenthaltsdauer. Durch das Klickertraining der Nachkommen wird die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen signifikant verkürzt (M-N- 49,9 ± 4,5 Sek., M+N- 58,8 ± 21,8 Sek., M-N+ 36,3 Sek. ± 5,8 Sek., M+N+ 34,6 ± 3,6 Sek.).

**Auswirkung des Trainings der Nachkommen auf das erhöhte Pluslabyrinth (EPM)
- Aufenthaltsdauer in den offenen Armen -**

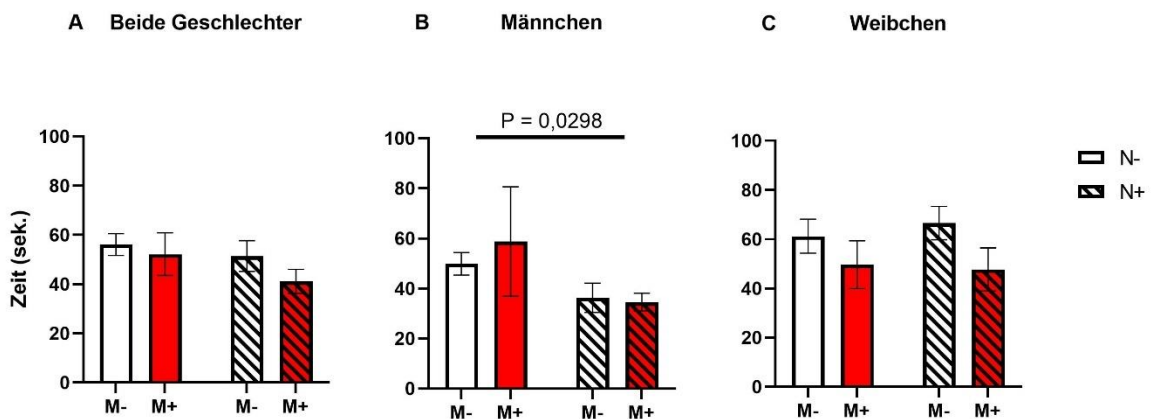


Abbildung 58: Aufenthaltsdauer in den offenen Armen vom EPM des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Die Mütter wurden zweimal trainiert mit einer Einführungszeit von 5 Minuten. Es ist die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen beider Geschlechter (A) sowie die Aufenthaltsdauer aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N- Gruppe (n=11), M+N- Gruppe (n=11), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=12). (B) M-N- Gruppe (n=5), M+N- Gruppe (n=3), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). (C) M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=8), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). Die Daten zeigen den Mittelwert ± SEM.

In Abbildung 59 A ist die Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen des EPMs beider Geschlechter (M-N- 96,1 ± 8,3 Sek., M+N- 94,9 ± 9,8 Sek., M-N+ 89,6 ± 7,9 Sek., M+N+ 112,4 ± 10,5 Sek.) dargestellt. Sie zeigt keinen signifikanten Unterschied (2-way ANOVA) in der Aufenthaltsdauer der geschlossenen Arme. Weder das Klickertraining der Nachkommen noch das Klickertraining der Mütter sowie die Interaktion zeigen Unterschiede in der Aufenthaltsdauer. Das gleiche spiegelt sich auch in den Auswertungen der Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs wider (M-N- 147,7 ± 9,3 Sek., M+N- 152,0 ± 9,4 Sek., M-N+ 158,7 ± 10,8 Sek., M+N+ 146,2 ± 11,3 Sek.). Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs weder im Klickertraining der Nachkommen noch im

Klickertraining der Mütter sowie in der Interaktion (Abbildung 59 B). Durch das Klickertraining der Mütter wird die Gesamtlaufstrecke (Abbildung 59 C) signifikant kürzer ($F_{1,42} = 10,90$, $P = 0,0020$). Das Klickertraining der Nachkommen hat keinen Effekt auf die Gesamtlaufstrecke (M-N- $1221,3 \pm 48,3$ cm, M+N- $978,4 \pm 88,5$ cm, M-N+ $1317,0 \pm 76,7$ cm, M+N+ $1088,7 \pm 65,2$ cm).

Auswirkung des Trainings der Nachkommen auf das erhöhte Pluslabyrinth (EPM)

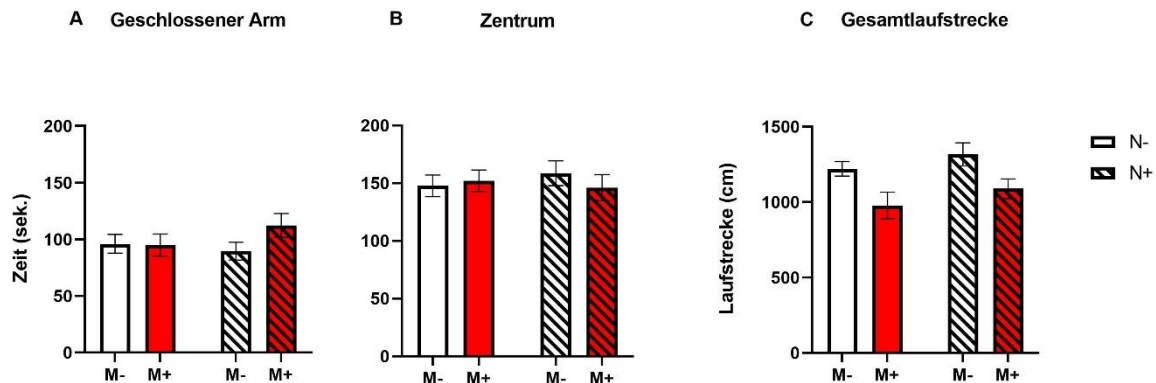


Abbildung 59: Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen (A), dem Zentrum sowie die Gesamtlaufstrecke (B) vom EPM des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Die Mütter wurden zweimal trainiert mit einer Einführungszeit von 5 Minuten. (A/B) M-N- Gruppe (n=11), M+N- Gruppe (n=11), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=12). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

In Abbildung 60 ist die Auswertung (2-way ANOVA) der Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs dargestellt. Das Klickertraining der Nachkommen (M-N+ $29,7 \pm 3,4$ Sek., M+N+ $17,6 \pm 2,4$ Sek.) sowie das Klickertraining der Mütter (M-N- $18,5 \pm 3,0$ Sek., M+N- $18,8 \pm 3,0$ Sek.) hat keinen signifikanten Einfluss auf die Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs. Es konnte jedoch ein signifikanter Effekt (2-way ANOVA) in der Interaktion zwischen dem Klickertraining der Nachkommen und der Mütter ($F_{1,43} = 4,308$, $P = 0,0439$) gezeigt werden. Unter Berücksichtigung des Geschlechtes beeinflusst das Klickertraining der Mütter signifikant ($F_{1,16} = 5,329$, $P = 0,0347$) die Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs bei den männlichen Tieren. Ein signifikanter Unterschied (2-way ANOVA) im Klickertraining der Nachkommen sowie in der Interaktion konnte nicht nachgewiesen werden. Die männlichen Nachkommen verbringen weniger Zeit im Zentrum, wenn die Mütter zuvor untrainiert sind (M-N- $22,5 \pm 6,0$ Sek., M+N- $16,1 \pm 5,0$ Sek., M-N+ $36,4 \pm 4,4$ Sek., M+N+ $19,0 \pm 4,1$ Sek.). Bei den weiblichen Tieren gibt es keinen signifikanten (2-way ANOVA) Unterschied (M-N- $15,7 \pm 2,9$ Sek., M+N- $19,8 \pm 3,8$ Sek., M-N+ $23,0 \pm 3,6$ Sek., M+N+ $16,1 \pm 2,8$ Sek.) in der Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs.

**Auswirkung des Trainings der Nachkommen auf den offenen Feld Test (OF)
- Aufenthaltsdauer im Zentrum -**

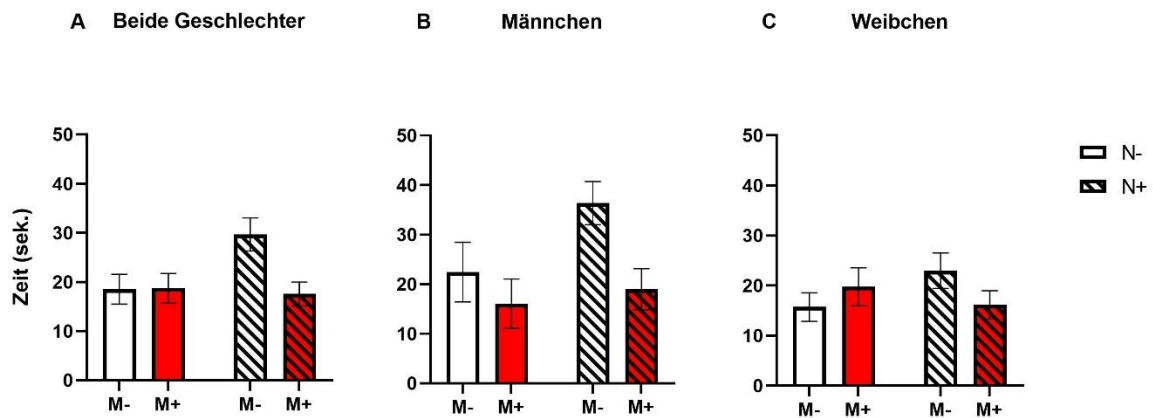


Abbildung 60: Aufenthaltsdauer im Zentrum des OF vom Crl:CD1(ICR) Stamm nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Die Mütter wurden zweimal trainiert mit einer Einführungszeit von 5 Minuten. Es ist die Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs von beiden Geschlechtern **(A)** sowie die Aufenthaltsdauer aufgeteilt nach dem männlichen **(B)** und dem weiblichen Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=11), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=12). **(B)** M-N- Gruppe (n=5), M+N- Gruppe (n=3), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). **(C)** M-N- Gruppe (n=7), M+N- Gruppe (n=8), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). Die Daten zeigen den Mittelwert ± SEM.

Das Klickertraining der Mütter beeinflusst signifikant (2-way ANOVA, $F_{1,43} = 5,419$, $P = 0,00247$) die Aufenthaltsdauer der Nachkommen in der Peripherie (Abbildung 61 A). Das Klickertraining der Nachkommen sowie die Interaktion hat keinen signifikanten Einfluss auf die Aufenthaltsdauer. Die Nachkommen von trainierten Müttern verbringen mehr Zeit in der Peripherie (M-N- $278,8 \pm 2,9$ Sek., M+N- $280,8 \pm 3,0$ Sek., M-N+ $268,8 \pm 3,3$ Sek., M+N+ $280,6 \pm 2,6$ Sek.) wie die Nachkommen von untrainierten Müttern. Die Auswertung (2-way ANOVA) der Gesamtlaustrasse (Abbildung 61 B) ergab keinen signifikanten Unterschied (M-N- $2816,9 \pm 131,5$ cm, M+N- $2720,5 \pm 243,1$ cm, M-N+ $3027,6 \pm 128,7$ cm, M+N+ $2489,1 \pm 125,2$ cm) weder im Klickertraining der Mütter noch im Training der Nachkommen sowie in der Interaktion.

Auswirkung des Trainings der Nachkommen auf den offenen Feld Test (OF)

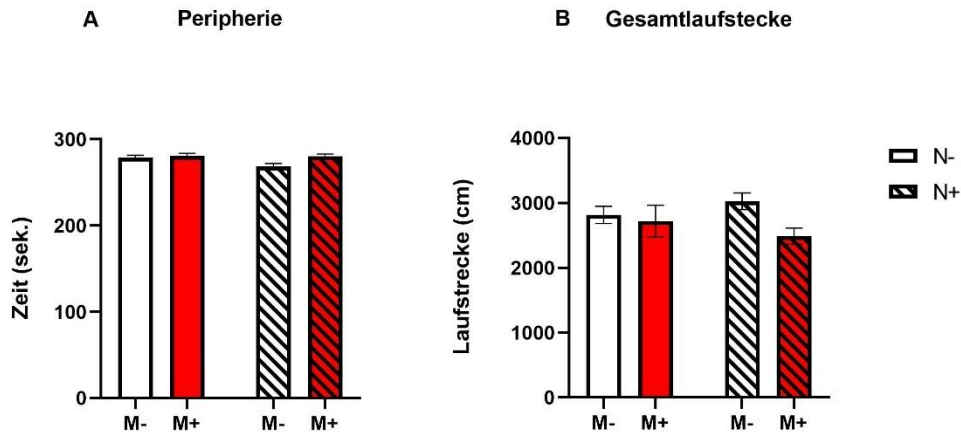


Abbildung 61: Aufenthaltsdauer in der Peripherie (A) sowie die Gesamtlaufstrecke (B) vom OF des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Die Mütter wurden zweimal trainiert mit einer Einführungszeit von 5 Minuten. M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=10), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=13). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.3.6 NESTBAUVERHALTEN DER NACHKOMMEN

In diesem Abschnitt wird das Wohlbefinden der Tiere mittels Nestbauverhalten evaluiert. In Abbildung 62 ist die Auswertung (2-way ANOVA) des NBTs dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Nestbau Score festgestellt werden. Das Klickertraining der Mütter und das Training der Nachkommen (M-N- $3,3 \pm 0,2$, M+N- $2,8 \pm 0,3$, M-N+ $3,0 \pm 0,3$, M+N+ $2,8 \pm 0,2$) haben keinen Einfluss auf das Nestbauverhalten (Abbildung 62, A). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes gibt es ebenfalls keinen Unterschied im Nestbauverhalten (Abbildung 62 B/C). Weder das Klickertraining der männlichen (M-N- $3,4 \pm 0,4$, M+N- $2,5$, M-N+ $2,9 \pm 0,4$, M+N+ $2,8 \pm 0,3$) noch das Klickertraining der weiblichen Nachkommen (M-N- $3,3 \pm 0,4$, M+N- $2,9 \pm 0,4$, M-N+ $3,0 \pm 0,5$, M+N+ $2,9 \pm 0,3$) sowie das der Mütter und die Interaktion zeigen einen signifikanten Unterschied.

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen auf das Nestbauverhalten

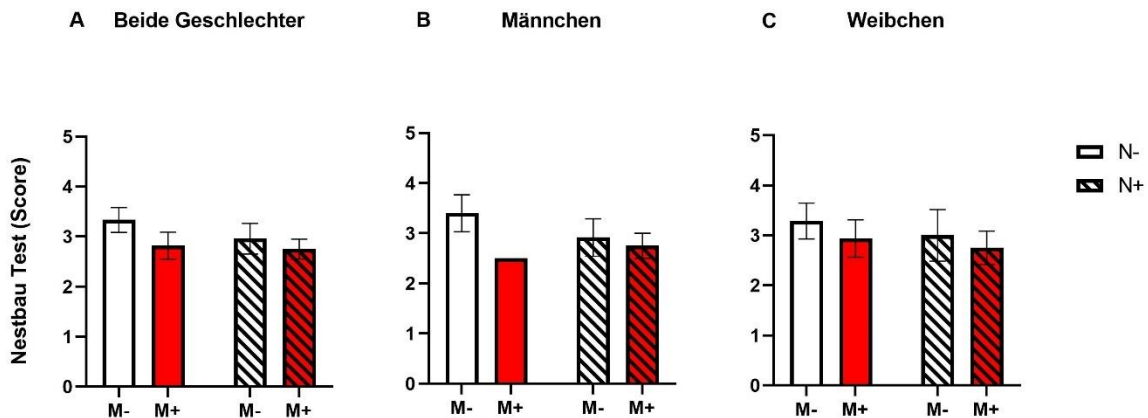


Abbildung 62: Nestbautest (Score) des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Die Mütter wurden zweimal trainiert mit einer Einführungszeit von 5 Minuten. Es ist das Nestbauverhalten beider Geschlechter **(A)** sowie das Verhalten aufgeteilt nach dem männlichen **(B)** und dem weiblichen Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=11), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=12). **(B)** M-N- Gruppe (n=5), M+N- Gruppe (n=3), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). **(C)** M-N- Gruppe (n=7), M+N- Gruppe (n=8), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.3.7 AUSWIRKUNG DES KLICKERTRAININGS AUF DAS DEPRESSIONS-ASSOZIIERTE VERHALTEN DER NACHKOMMEN (SPT & FST)

Im folgenden Abschnitt wird das Depressions-assoziierte Verhalten der Tiere anhand der Aufnahme von Saccharose und der Immobilität evaluiert. In Abbildung 63 ist die Auswertung (2-way ANOVA) der Saccharose Präferenz dargestellt. Das Klickertraining der Nachkommen und das Klickertraining der Mütter sowie die Interaktion haben keinen signifikanten Einfluss auf die Saccharose Präferenz (M-N- $76,5 \pm 6,6$ %, M+N- $73,6 \pm 5,1$ %, M-N+ $57,6 \pm 7,9$ %, M+N+ $69,3 \pm 8,8$ %). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes kann ein Unterschied bei den männlichen Nachkommen (M-N- $70,1 \pm 15,1$ %, M+N- $54,8 \pm 7,5$ %, M-N+ $63,4 \pm 9,4$ %, M+N+ $69,8 \pm 11,3$ %) nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigen die weiblichen Nachkommen (M-N- $81,1 \pm 4,5$ %, M+N- $80,7 \pm 4,3$ %, M-N+ $51,8 \pm 13,0$ %, M+N+ $68,9 \pm 14,7$ %) durch den Einfluss vom Klickertraining eine signifikant geringere Saccharose Präferenz ($F_{1,23} = 4,807$, $P = 0,0387$).

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen auf die Saccharose Präferenz

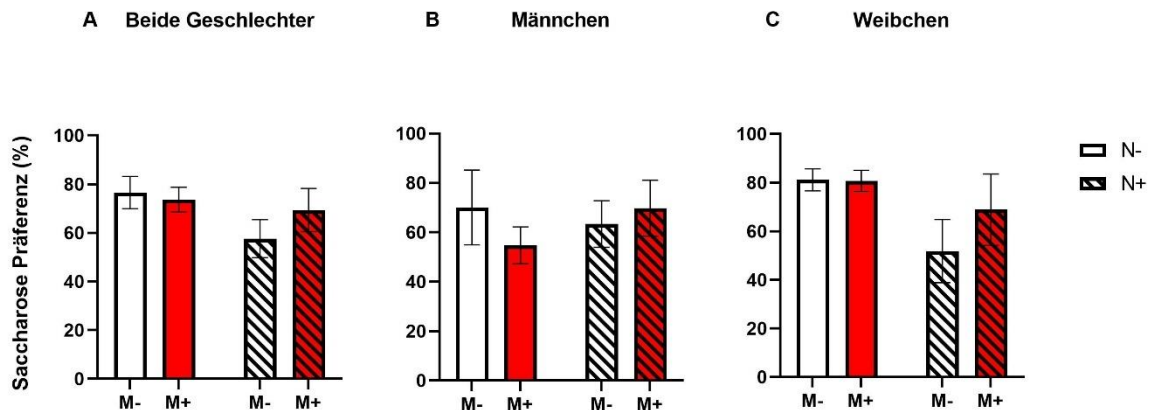


Abbildung 63: Saccharose Präferenz in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Die Mütter wurden zweimal trainiert mit einer Einführungszeit von 5 Minuten. Es ist die Saccharose Präferenz beider Geschlechter **(A)** sowie die Präferenz aufgeteilt nach dem männlichen **(B)** und dem weiblichen Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=11), M-N+ Gruppe (n=12), M+N+ Gruppe (n=12). **(B)** M-N- Gruppe (n=5), M+N- Gruppe (n=3), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). **(C)** M-N- Gruppe (n=7), M+N- Gruppe (n=8), M-N+ Gruppe (n=6), M+N+ Gruppe (n=6). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

In Abbildung 64 sind die Auswertungen (2-way ANOVA) vom FSTs dargestellt. Das Klickertraining der Nachkommen und das Klickertraining der Mütter sowie die Interaktion (Abbildung 64 A) haben keinen signifikanten Einfluss auf die Dauer der Immobilität. Das Klickertraining der Mütter zeigt jedoch tendenziell eine geringere Immobilitätsdauer als das Klickertraining der Nachkommen (M-N- $5,0 \pm 1,9$ %, M+N- $1,7 \pm 1,0$ %, M-N+ $3,5 \pm 1,6$ %, M+N+ $3,2 \pm 2,1$ %). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes, zeigen weder die männlichen (M-N- $3,6 \pm 3,1$ %, M+N- $0,2 \pm 0,2$ %, M-N+ $2,5 \pm 2,1$ %, M+N+ $2,4 \pm 2,2$ %) noch die weiblichen Nachkommen (M-N- $5,7 \pm 2,5$ %, M+N- $2,8 \pm 1,7$ %, M-N+ $4,6 \pm 2,5$ %, M+N+ $4,1 \pm 4,1$ %) einen signifikanten Unterschied in der Dauer der Immobilität. Ein Abbruch des Versuches erfolgt nach einer Immobilitätsphase von max. 30 Sekunden. Daher sind in der Auswertung weniger Tiere berücksichtigt. Insgesamt wurden 10 Tiere abgebrochen darunter drei männliche und sieben weibliche Tiere (Männchen: M-N- n=2, M-N+ n= 1; Weibchen: M-N- n=1, M+N- n=4 M-N+ n= 1, M+N+ n=1).

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen auf den Schwimmtest (FST)

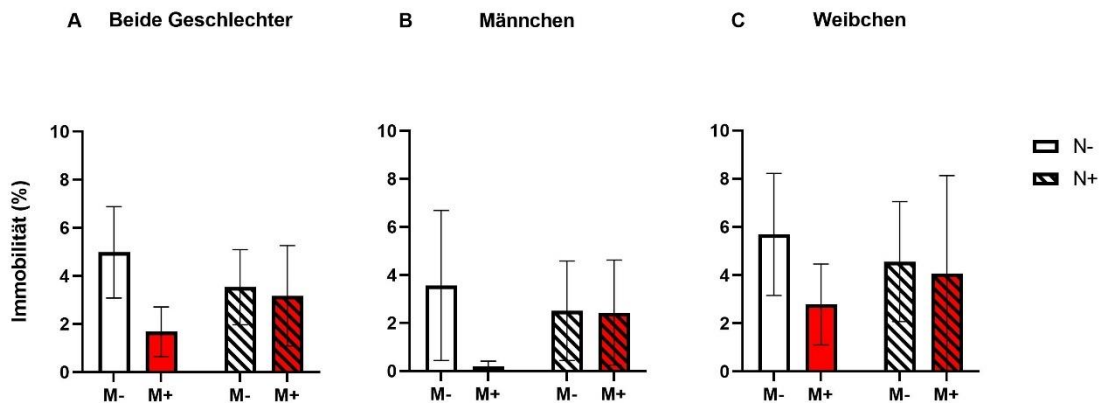


Abbildung 64: Messung der Immobilität bei 1,5 % der Aktivitätsrate in Prozent des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Die Mütter wurden zweimal trainiert mit einer Einführungszeit von 5 Minuten. Es ist die Immobilitätsdauer beider Geschlechter (A), sowie die Dauer aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) M-N- Gruppe (n=9), M+N- Gruppe (n=7), M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). (B) M-N- Gruppe (n=3), M+N- Gruppe (n=3), M-N+ Gruppe (n=5), M+N+ Gruppe (n=6). (C) M-N- Gruppe (n=6), M+N- Gruppe (n=4), M-N+ Gruppe (n=5), M+N+ Gruppe (n=5). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM

4.3.8 CORTICOSTERONBESTIMMUNG DER NACHKOMMEN

Die Auswertung (2-way ANOVA) der Corticosteronbestimmung soll das Stresslevel der Tiere evaluieren, um dann Rückschlüsse auf deren Wohlbefinden schließen zu können. Direkt im Anschluss an den FST wurde Blut abgenommen. Die Bestimmung der Corticosteronkonzentration im Blutplasma ergab folgende Ergebnisse (Abbildung 65). Es gibt keinen signifikanten Unterschied im Klickertraining der Mütter, im Klickertraining der Nachkommen oder in der Interaktion (M-N- 2752,7 \pm 497,5 pg/mL, M+N- 1514,7 \pm 277,5 pg/mL, M-N+ 2242,8 \pm 156,7 pg/mL, M+N+ 2753,4 \pm 708,1 pg/mL). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes konnte ein signifikanter Unterschied in der Corticosteronkonzentration ($F_{1,11} = 10,64$, $P = 0,0076$) durch das Klickertraining der männlichen Nachkommen festgestellt werden, nicht aber durch ein Klickertraining der Mütter sowie in der Interaktion. Die trainierten, männlichen Nachkommen weisen eine signifikant höhere Corticosteronkonzentration auf als die Nachkommen welche nicht trainiert wurden (M-N- 1110,8 \pm 187,6 pg/mL, M+N- 1047,1 \pm 261,8 pg/mL, M-N+ 2234,8 \pm 95,0 pg/mL, M+N+ 1460,0 \pm 291,2 pg/mL). Bei den weiblichen Nachkommen konnte kein signifikanter Unterschied in der Corticosteronkonzentration festgestellt werden (M-N- 3925,4 \pm 459,4 pg/mL, M+N- 1690,00 \pm 357,5 pg/mL, M-N+ 2255,1 \pm 467,1 pg/mL, M+N+ 4478,0 \pm 859,1 pg/mL). Allerdings zeigt sich eine Tendenz, dass

trainierte Nachkommen von trainierten Müttern eine höhere Corticosteronkonzentration aufweisen als untrainierte Nachkommen und trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern. Die geringste Konzentration haben die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern.

Corticosteronkonzentration im Blut nach dem Schwimmtest (FST)

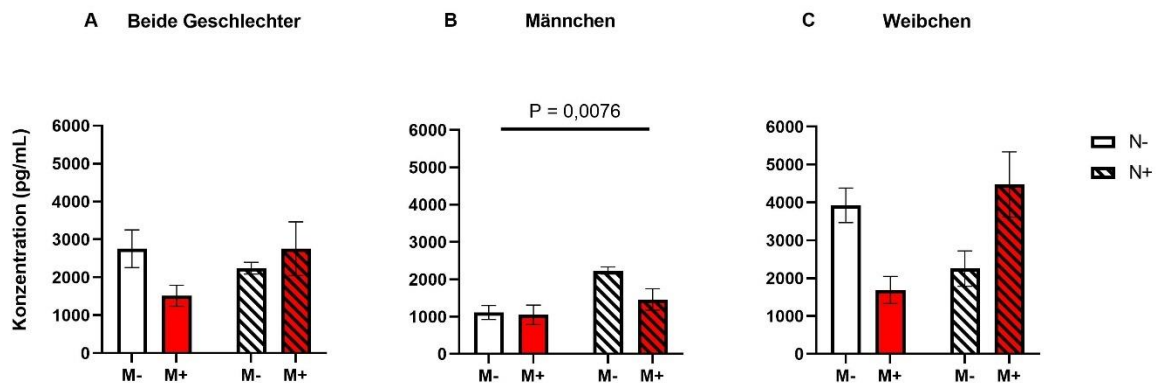


Abbildung 65: Corticosteronbestimmung mittels ELISA des Crl:CD1(ICR) Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 5 Minuten (Protokoll B). Die Mütter wurden zweimal trainiert, mit einer Einführungszeit von 5 Minuten. Es ist die Plasmacorticosteronkonzentration aller Tiere **(A)** sowie die Konzentration aufgeteilt nach dem männlichen **(B)** und dem weiblichen Geschlecht **(C)** dargestellt. **(A)** M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=11), M-N+ Gruppe (n=5), M+N+ Gruppe (n=7). **(B)** M-N- Gruppe (n=5), M+N- Gruppe (n=3), M-N+ Gruppe (n=3), M+N+ Gruppe (n=4). **(C)** M-N- Gruppe (n=7), M+N- Gruppe (n=8), M-N+ Gruppe (n=2), M+N+ Gruppe (n=3). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Unter Berücksichtigung aller Verhaltenstest sowie der Corticosteronbestimmungen konnten diverse Auswirkungen des Klickertrainings nachgewiesen werden. In Bezug auf das Körpergewicht hat nur das Klickertraining der männlichen Nachkommen eine signifikant höhere Zunahme bewirkt. Es wird eine Verbesserung der Trainingserfolge verzeichnet jedoch unterscheiden diese sich nicht signifikant zwischen dem Training der Nachkommen und dem Klickertraining der Mütter. Zusätzliche Verbesserungen durch ein doppeltes Klickertraining der Mütter konnten nicht nachgewiesen werden. Die Interaktionszeit mit dem Experimentator der männlichen Nachkommen, deren Mütter zuvor zweimal trainiert worden sind, ist signifikant länger als bei den Nachkommen, deren Mütter untrainiert sind. Die signifikant längere Interaktionszeit mit dem Experimentator zeigt sich auch nach dem Klickertraining der männlichen Nachkommen. Das Klickertraining der männlichen Nachkommen beeinflusst die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen, welche signifikant kürzer ist. Auch die Auswertung der Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs zeigt, dass das zweifache Klickertraining der Mütter von männlichen Nachkommen die Dauer im Zentrum signifikant verkürzt. Das Klickertraining der Nachkommen als auch das der Mütter zeigt keinen signifikanten Unterschied im Nestbau

Score sowie in der Saccharose Präferenz. Lediglich die trainierten, weiblichen Nachkommen zeigen eine signifikant geringe Präferenz als die Nachkommen, dessen Mütter zweimal trainiert wurden. Das Klickertraining der Nachkommen wie auch das der Mütter hat keine Auswirkungen auf die Immobilitätsdauer im FST. Die Auswertung der Corticosteronbestimmung zeigt eine signifikant höhere Konzentration bei trainierten, männlichen Nachkommen.

4.4 VIERTER VERSUCHSTEIL: 10 MINUTEN KLICKEREINFÜHRUNG MIT EINMALIGEM KLICKERTRAINING DER MÜTTER (PROTOKOLL A) DES INZUCHTSTAMMES C57BL/6JRj.

Alle bisherigen Versuche wurden mit dem Crl:CD1(ICR) Stamm durchgeführt. Dieser WT-Auszuchtstamm wird allgemein sehr oft in der Forschung verwendet unter anderem für operative Eingriffe. Vom Verhalten unterscheiden sie sich jedoch von anderen Stämmen. Daher soll im nächsten Abschnitt ein Inzuchtstamm getestet werden, welcher ebenfalls sehr oft in der klinischen Forschung genutzt wird: der C57BL/6JRj Stamm. Daher befasst sich dieser Versuchsteil mit den Auswirkungen des Klickertrainings auf den C57BL/6JRj Inzuchtstamm. Die Mütter wurden nur einmal trainiert (Protokoll A) und die Einführungszeit des Klickertrainings betrug 10 Minuten.

4.4.1 GEWICHTSZUNAHME DER NACHKOMMEN WÄHREND DES KLICKERTRAININGS

In diesem Abschnitt soll das Körpergewicht zur Bestimmung des Wohlbefindens der Tiere evaluiert werden. Das Gewicht der verschiedenen Gruppen wurde vor und nach dem Klickertraining ermittelt. In Abbildung 66 ist die Gewichtszunahme in Prozent des C57BL/6JRj Stammes dargestellt. Beide Geschlechter nehmen während des Klickertrainings an Gewicht zu (M-N- $4,6 \pm 1,0$ %, M+N- $5,2 \pm 1,1$ %, M-N+ $3,2 \pm 0,9$ %, M+N+ $3,3 \pm 1,2$ %). Das Klickertraining der Nachkommen und das Klickertraining der Mütter haben keinen signifikanten Effekt (2-way ANOVA) auf die Gewichtszunahme während des Trainings. Die Nachkommen, welche zuvor trainiert wurden, zeigen eine geringere Zunahme des Gewichtes während des Klickertrainings als die untrainierten Nachkommen.

**Gewichtszunahme während des Trainings
(Beide Geschlechter)**

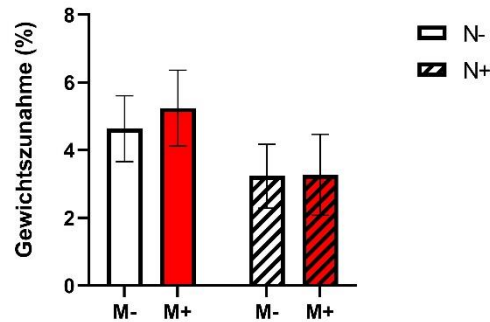


Abbildung 66: Gewichtszunahme der Nachkommen in Prozent nach einmaligem Klickertraining der Mütter des C57BL/6JRj Stammes (Protokoll A, 10 Minuten). Es ist die Gewichtszunahme während dem Klickertraining der Nachkommen (Beide Geschlechter) dargestellt. M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=5), M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.4.2 TRAININGSERFOLGE DER NACHKOMMEN

In diesem Abschnitt wird der Erfolg des Klickertrainings anhand der Häufigkeit der Wiederholung evaluiert. In Abbildung 67 ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens der Tiere pro Tag dargestellt. Beide Geschlechter zusammen zeigen eine signifikante Zunahme der Trainingshäufigkeit (2-way ANOVA für repeated measurements zeigen einen signifikanten Effekt des Faktors Trainingstage, $F_{1,9, 34,5} = 20,24$, $P < 0,0001$, jedoch keinen signifikanten Effekt des Faktors Klickertraining der Mütter und in der Interaktion). Die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern zeigen eine höhere Häufigkeit des Verhaltens (M+N+ Tag 1: $0,7 \pm 0,3$, Tag 2: $3,5 \pm 1,5$, Tag 3: $7,2 \pm 1,5$, Tag 4: $8,5 \pm 2,0$) als die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M-N+ Tag 1: $0,8 \pm 0,6$, Tag 2: $2,6 \pm 1,1$, Tag 3: $3,6 \pm 1,4$, Tag 4: $5,1 \pm 1,4$). Erst ab Tag vier gibt es einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit des Trainingsverhaltens zwischen den Nachkommen von trainierten und untrainierten Müttern (Tukey's multiple comparisons test, $P = 0,0186$).

Klickertraining der Nachkommen (Beide Geschlechter) nach einmaligem Training der Mütter (Protokoll A)

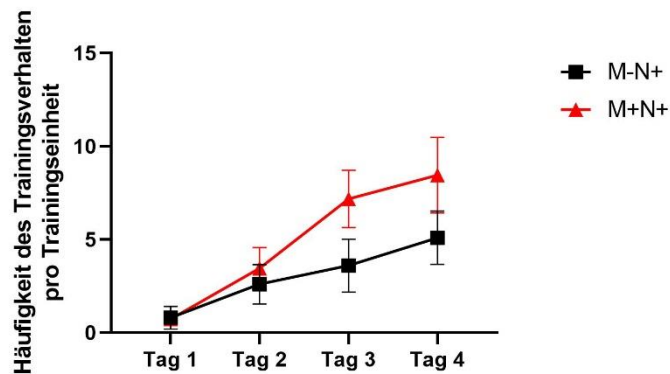


Abbildung 67: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten C57BL/6JRj Tieren. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens beider Geschlechter dargestellt. M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). Alle Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.4.3 VERGLEICH DER TRAININGSERFOLGE DER NACHKOMMEN VOM CRL:CD1(ICR) MIT DEN NACHKOMMEN DES C57BL/6JRJ STAMMES

In diesem Abschnitt wird der Erfolg des Klickertrainings anhand der Häufigkeit der Wiederholung zwischen dem Crl:CD1(ICR) und dem C57BL/6JRj evaluiert. Dafür wurden jeweils die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) des jeweiligen Stammes bei einer Klickereinführungszeit von 10 Minuten sowie dem einmaligen Klickertraining der Mütter verglichen. Beide Geschlechter zusammen (Abbildung 68 und Abbildung 67A) zeigten eine signifikante Zunahme der Trainingshäufigkeit (2-way ANOVA für repeated measurements zeigen einen signifikanten Effekt des Faktors Trainingstage, $F_{3,219} = 51,49$, $P < 0,0001$, einen signifikanten Effekt des Faktors Stamm, $F_{1,73} = 32,75$, $P < 0,0001$ und einen signifikanten Effekt in der Interaktion, $F_{3,219} = 23,20$, $P < 0,0001$). Die Tiere des C57BL/6JRj Stammes zeigen bereits ab dem zweiten Tag eine signifikant größere Häufigkeit des Trainingserfolges ($P = 0,0029$) als der Crl:CD1(ICR) Stamm. Dieser zeigt erst ab dem dritten Trainingstag eine signifikante Verbesserung der Trainingshäufigkeit ($P = 0,0085$). Beide Geschlechter verbesserten ihre Häufigkeiten (Crl:CD1(ICR): Tag 1 $0,5 \pm 0,1$, Tag 2 $1,0 \pm 0,2$, Tag 3 $1,5 \pm 0,3$, Tag 4 $2,2 \pm 0,4$, C57BL/6JRJ: Tag 1 $0,7 \pm 0,3$, Tag 2 $3,5 \pm 1,1$, Tag 3 $7,2 \pm 1,5$, Tag 4 $8,5 \pm 2,0$). Der C57BL/6JRj Stamm zeigt ab dem zweiten Tag im Vergleich zum Crl:CD1(ICR) Stamm signifikant mehr Trainingserfolge (2-way ANOVA, $P = 0,0133$). Unter Berücksichtigung des Geschlechtes lassen sich diese Ergebnisse auch auf die männlichen Tiere übertragen (Abbildung 68 B). Die männlichen Tiere des C57BL/6JRj Stammes (Tag 1 $1,0 \pm 0,5$, Tag 2 $5,2 \pm 1,9$, Tag 3 $10,0 \pm 2,2$, Tag 4 $12,2 \pm 3,5$) zeigen signifikant (2-way ANOVA, $P < 0,0001$) mehr

Trainingserfolge ab dem zweiten Tag als die männlichen Tiere des Crl:CD1(ICR) Stammes (Tag 1 $0,5 \pm 0,2$, Tag 2 $0,7 \pm 0,2$, Tag 3 $1,3 \pm 0,3$, Tag 4 $1,7 \pm 0,3$). Bei den weiblichen Tieren wurde nur am dritten Tag ein signifikanter Unterschied (2-way ANOVA) in der Trainingshäufigkeit nachgewiesen. Die weiblichen Tiere des C57BL/6JRj Stammes (Tag 1 $0,5 \pm 0,3$, Tag 2 $2,0 \pm 1,0$, Tag 3 $4,8 \pm 1,7$, Tag 4 $5,3 \pm 1,7$) zeigen signifikant ($P = 0,0369$) mehr Trainingserfolge am dritten Tag als die weiblichen Tiere des Crl:CD1(ICR) Stammes (Tag 1 $0,5 \pm 0,2$, Tag 2 $1,4 \pm 0,3$, Tag 3 $1,8 \pm 0,5$, Tag 4 $2,8 \pm 0,7$).

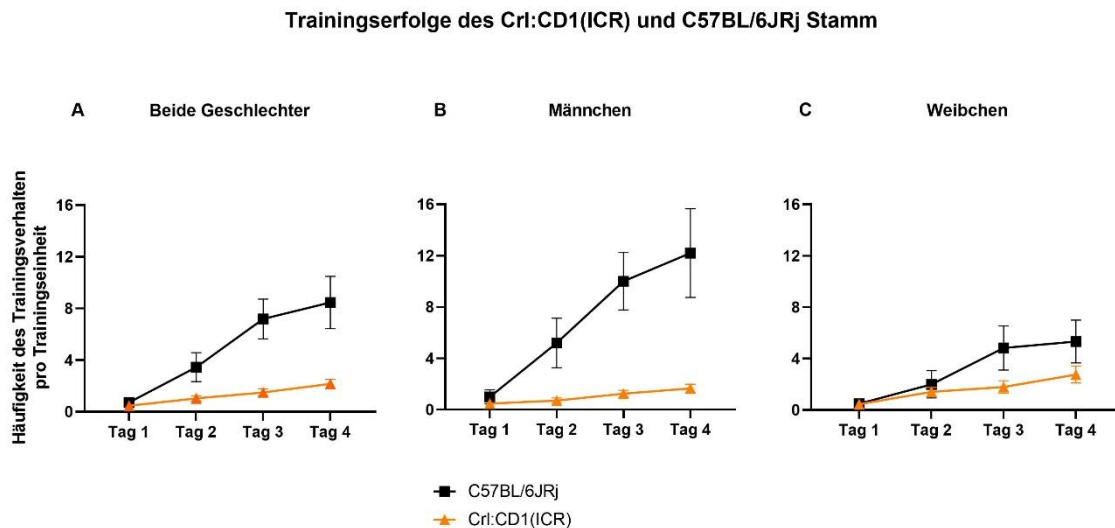


Abbildung 68: Vier Tage Klickertraining von 7 Wochen alten Crl:CD1(ICR) und C57BL/6JRj Tieren. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Häufigkeit des Trainingsverhaltens aller trainierter Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) (A) sowie die Häufigkeit aufgeteilt nach dem männlichen (B) und dem weiblichen Geschlecht (C) dargestellt. (A) C57BL/6JRj (n=11), Crl:CD1(ICR) (n=64). (B) C57BL/6JRj (n=5), Crl:CD1(ICR) (n=35). (C) C57BL/6JRj (n=6), Crl:CD1(ICR) (n=29). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.4.4 EINFLUSS DES KLICKERTRAININGS AUF DIE INTERAKTIONSZEIT MIT DEM EXPERIMENTATOR

In diesem Abschnitt wird das Wohlbefinden der Tiere anhand der Interaktion mit dem Experimentator evaluiert. In Abbildung 69 sind die Auswertungen der Interaktionszeit vor und nach dem Klickertraining des C57BL/6JRj Stammes (Beide Geschlechter) dargestellt. Das Klickertraining der Mütter hat keinen Einfluss (Abbildung 69 A, unpaired t - test) auf die Interaktion der Nachkommen mit dem Experimentator vor dem Klickertraining (M-N- $4,1 \pm 0,7$, M+N- $4,2 \pm 0,7$). Nach den vier Trainingstagen gab es keinen signifikanten Unterschied (2-way ANOVA) in der Interaktionszeit mit dem Experimentator bei den trainierten Nachkommen (M-N- $5,4 \pm 1,0$, M+N- $3,3 \pm 0,9$, M-N+ $3,4 \pm 0,6$, M+N+ $5,6 \pm 1,3$).

Interaktion der Nachkommen (Beide Geschlechter) mit dem Experimentator

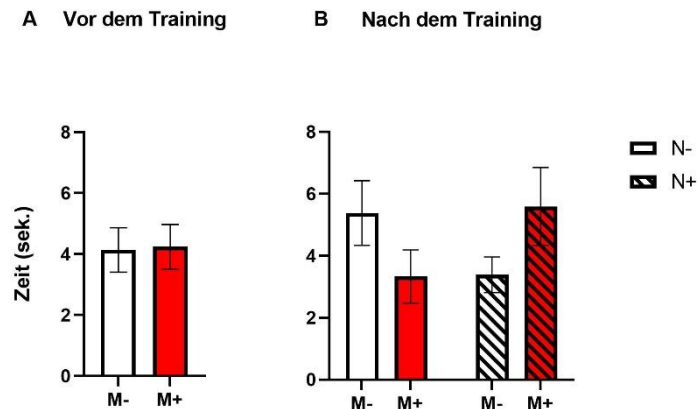


Abbildung 69: Ermittlung der Interaktionszeit mit dem Experimentator vor und nach dem Klickertraining der Nachkommen des C57BL/6JRj Stammes. Das Klickertraining wurde einmal durchgeführt mit einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Interaktion beider Geschlechter mit dem Experimentator vor **(A)** und nach **(B)** dem Klickertraining dargestellt. **(A)** M-N- Gruppe (n=22), M+N- Gruppe (n=16). **(B)** M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=5), M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.4.5 AUSWIRKUNG DES KLICKERTRAININGS AUF DAS ÄNGST-ASSOZIIERTE VERHALTEN DER NACHKOMMEN (EPM & OF)

Im folgenden Abschnitt wird das Angst-assoziierte Verhalten der Tiere anhand der Dauer, die die Tiere in den offenen Armen des EPMS und im Zentrum des OFs verbringen, evaluiert. In Abbildung 70 ist die Auswertung des EPMS dargestellt. Abbildung 70 A zeigt die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMS. Nach einmaligem Klickertraining der Mütter sowie dem Klickertraining der Nachkommen gibt es keinen Unterschied (2-way ANOVA) in der Aufenthaltsdauer der einzelnen Gruppen in den offenen Armen (M-N- $90,6 \pm 7,7$ Sek., M+N- $102,5 \pm 7,7$ Sek., M-N+ $88,7 \pm 13,8$ Sek., M+N+ $92,0 \pm 7,7$ Sek.) des EPMS. In der Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen des EPMS (Abbildung 70 B) gibt es demnach auch keinen Unterschied (M-N- $95,8 \pm 5,0$ Sek., M+N- $89,2 \pm 2,9$ Sek., M-N+ $103,5 \pm 9,4$ Sek., M+N+ $102,5 \pm 5,6$ Sek.). Die Dauer im Zentrum (Abbildung 70 C) unterscheidet sich nicht signifikant untereinander (M-N- $113,6 \pm 6,0$ Sek., M+N- $108,2 \pm 7,2$ Sek., M-N+ $107,8 \pm 6,1$ Sek., M+N+ $105,6 \pm 4,5$ Sek.). Lediglich in der Gesamtlaufstrecke (Abbildung 70 D) konnte ein signifikanter Effekt in der Interaktion des Klickertrainings der Mütter sowie deren Nachkommen nachgewiesen werden ($F_{1,34} = 4,745$, $P = 0,0364$). Die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern legen die längere Laufstrecke zurück im Vergleich zu den untrainierten Nachkommen

von untrainierten Müttern (M-N- $1344,0 \pm 68,5$ cm, M+N- $1184,2 \pm 126,7$ cm, M-N+ $1285,2 \pm 69,1$ cm, M+N+ $1471,7 \pm 63,3$ cm).

Auswirkung des Trainings der Nachkommen (Beide Geschlechter) auf das erhöhte Pluslabyrinth (EPM)

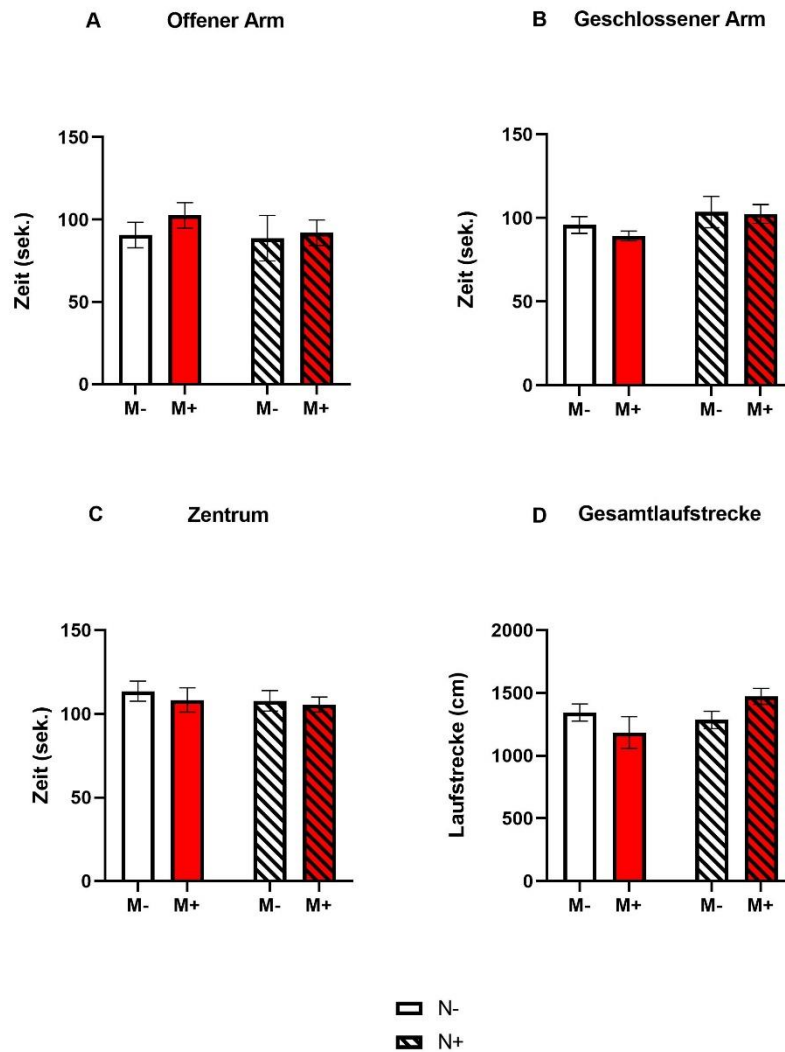


Abbildung 70: Auswirkungen des Klickertrainings der Nachkommen (Beide Geschlechter) des C57BL/6JRj Stammes auf das erhöhte Pluslabyrinth nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Es ist die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen (A), in den geschlossenen Armen (B), im Zentrum (C) und die Gesamtlaufstrecke (D) beider Geschlechter dargestellt. (A/B/C/D) M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=5), M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Die Auswertungen des OFs (Abbildung 71) bestätigen die Ergebnisse des EPMs. Auch hier gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Aufenthaltsdauer im Zentrum (M-N- $18,6 \pm 2,2$ Sek., M+N- $17,5 \pm 6,9$ Sek., M-N+ $21,7 \pm 2,3$ Sek., M+N+ $22,9 \pm 3,4$ Sek.) und in der Peripherie (M-N- $281,5 \pm 2,2$ Sek., M+N- $282,5 \pm 6,9$ Sek., M-N+ $278,3 \pm 2,3$ Sek., M+N+ $277,2 \pm 3,4$

Sek.). Die Analyse der Laufstreckendaten hat gezeigt, dass das Klickertraining der Mütter die Laufstrecke signifikant erhöht hat (2-way ANOVA zeigt einen signifikanten Effekt im Faktor Klickertraining der Mütter, $F_{1,34} = 6,313$, $P = 0,0169$, aber keinen signifikanten Effekt im Klickertraining der Nachkommen sowie in der Interaktion). Das Klickertraining der Nachkommen hat keine signifikanten Auswirkungen auf die Laufstrecke. Die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+ $3314,9 \pm 153,5$ cm, M+N- $3734,9 \pm 389,6$ cm) legen eine längere Laufstrecke zurück als die Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+ $2963,8 \pm 153,2$ cm, M-N- $3041,8 \pm 187,6$ cm).

Auswirkung des Trainings der Nachkommen (Beide Geschlechter) auf den offenen Feld Test (OF)

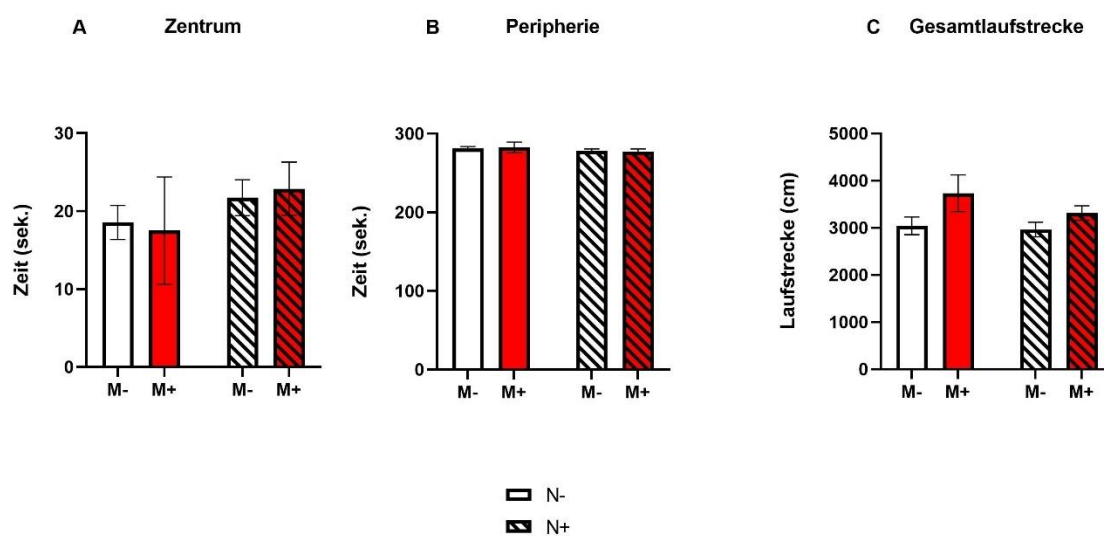


Abbildung 71: Auswirkungen des Klickertrainings der Nachkommen auf die Aufenthaltsdauer im OF vom C57BL/6JRj Stamm nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Die Mütter wurden einmal trainiert mit einer Einführungszeit von 10 Minuten. Es ist die Aufenthaltsdauer von allen Tieren (Beide Geschlechter) im Zentrum (A) sowie in der Peripherie (B) dargestellt. Zusätzlich wird noch die Gesamtlaufstrecke (C), die die Tiere zurückgelegt haben, dargestellt. (A/B/C) M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=5), M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). Die Daten zeigen den Mittelwert ± SEM.

4.4.6 NESTBAUVERHALTEN DER NACHKOMMEN

In diesem Abschnitt wird das Wohlbefinden der Tiere mittels Nestbauverhalten evaluiert. Die Auswertung (2-way ANOVA) des Nestbautests ergab keine signifikanten Unterschiede im Klickertraining der Nachkommen wie auch im Klickertraining der Mütter (M-N- $2,7 \pm 0,3$, M+N- $3,6 \pm 0,4$, M-N+ $3,4 \pm 0,2$, M+N+ $3,2 \pm 0,3$). Untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern zeigen den höchsten Nestbau Score. Gefolgt von trainierten Nachkommen von untrainierten wie auch trainierten Müttern. Der kleinste Nestbau Score konnte bei den Nachkommen von

untrainierten Müttern nachgewiesen werden (M-N- $2,7 \pm 0,3$, M+N- $3,6 \pm 0,4$, M-N+ $3,4 \pm 0,2$, M+N+ $3,2 \pm 0,3$).

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen (Beide Geschlechter) auf das Nestbauverhalten

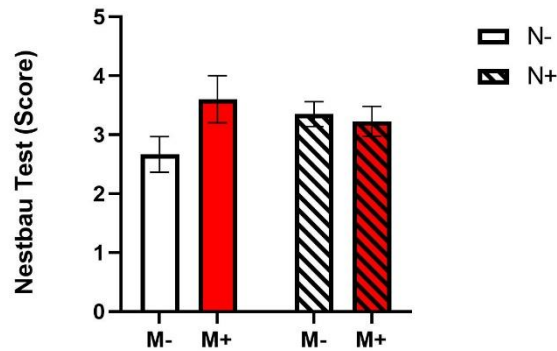


Abbildung 72: Nestbautest (Score) des C57BL/6JRj Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Die Mütter wurden einmal trainiert, mit einer Einführungszeit von 10 Minuten. Es ist das Nestbauverhalten beider Geschlechter dargestellt. M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=5), M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.4.7 AUSWIRKUNG DES KLICKERTRAININGS AUF DAS DEPRESSIONS-ASSOZIIERTE VERHALTEN DER NACHKOMMEN (SPT & FST)

Im folgenden Abschnitt wird das Depressions-assoziierte Verhalten der Tiere anhand der Aufnahme von Saccharose und der Immobilität evaluiert. In Abbildung 73 ist die Auswertung (2-way ANOVA) des SPTs dargestellt. Sie ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Klickertraining der Nachkommen wie auch dem Training der Mütter sowie in der Interaktion (M-N- $79,2 \pm 5,9$ %, M+N- $93,7 \pm 1,5$ %, M-N+ $71,6 \pm 7,8$ %, M+N+ $82,7 \pm 6,9$).

**Auswirkungen des Training der Nachkommen
(Beide Geschlechter) auf die Saccharose Präferenz**

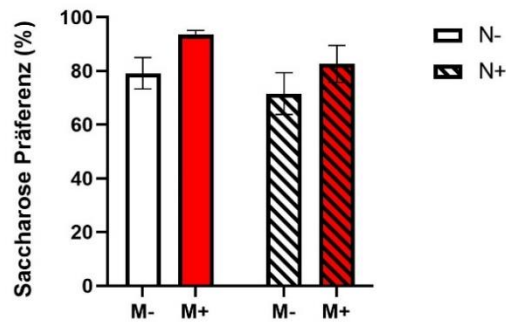


Abbildung 73: Saccharose Präferenz in Prozent des C57BL/6JRj Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Die Mütter wurden einmal trainiert mit einer Einführungszeit von 10 Minuten. Es ist die Saccharose Präferenz aller Tiere (Beide Geschlechter) dargestellt. M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=5), M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

In Abbildung 74 sind die Auswertungen (2-way ANOVA) vom FST dargestellt. Sie zeigen keine signifikanten Effekte in der Dauer der Immobilität weder im Klickertraining der Mütter noch im Klickertraining der Nachkommen sowie in der Interaktion. Das Klickertraining der Nachkommen zeigt eine geringere Immobilitätsdauer (%) als das Klickertraining der Mütter sowie gar kein Training (M-N- $29,7 \pm 3,8$ %, M+N- $31,1 \pm 3,5$ %, M-N+ $25,2 \pm 5,5$ %, M+N+ $24,5 \pm 4,2$ %). Ein Abbruch des Versuches erfolgt nach einer Immobilitätsphase von max. 30 Sekunden. Daher sind in der Auswertung weniger Tiere berücksichtigt. Es wurde lediglich nur ein weibliches Tier (M+N- n=1) abgebrochen.

Auswirkungen des Trainings der Nachkommen (Beide Geschlechter) auf den Schwimmtest (FST)

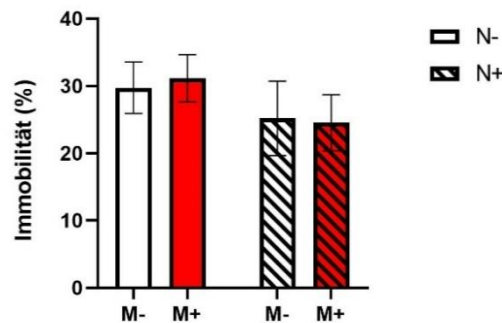


Abbildung 74: Messung der Immobilität bei 1,5 % der Aktivitätsrate in Prozent des C57BL/6JRj Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Die Mütter wurden einmal trainiert mit einer Einführungszeit von 10 Minuten. Es ist Immobilitätsdauer aller Tiere (Beide Geschlechter) dargestellt. M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=5), M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

4.4.8 CORTICOSTERONBESTIMMUNG DER NACHKOMMEN

Die Auswertung (2-way ANOVA) der Corticosteronbestimmung soll das Stresslevel der Tiere evaluieren, um dann Rückschlüsse auf deren Wohlbefinden schließen zu können. Direkt nach dem FST wurden die Blutproben gesammelt. Die Ergebnisse der Bestimmung der Corticosteronkonzentration im Blutplasma sind in Abbildung 75 dargestellt. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Corticosteronkonzentration weder durch das Klickertraining der Mütter noch durch das Klickertraining der Nachkommen sowie in der Interaktion (M-N- $2841,8 \pm 476,0$ pg/mL, M+N- $2685,4 \pm 368,9$ pg/mL, M-N+ $2635,2 \pm 268,5$ pg/mL, M+N+ $2253,1 \pm 199,5$ pg/mL). Die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern hatten die niedrigste Konzentration im Blut. Die höchste Konzentration im Blut ließ sich bei den untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern nachweisen.

Corticosteronkonzentration im Blut nach dem Schwimmtest (FST)

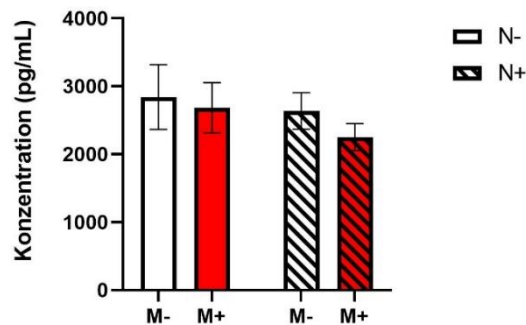


Abbildung 75: Corticosteronbestimmung mittels ELISA des C57BL/6JRj Stammes nach einer Trainingswoche und einer Einführungszeit von 10 Minuten (Protokoll A). Die Mütter wurden einmal trainiert mit einer Einführungszeit von 10 Minuten. Es ist Plasmacorticosteronkonzentration beider Geschlechter dargestellt. M-N- Gruppe (n=12), M+N- Gruppe (n=5), M-N+ Gruppe (n=10), M+N+ Gruppe (n=11). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Unter Berücksichtigung aller Verhaltenstests sowie der Corticosteronbestimmungen konnten kaum Auswirkungen des Klickertrainings nachgewiesen werden. Alle trainierten Tiere nahmen an Gewicht zu und zeigten eine signifikante Verbesserung der Trainingshäufigkeit mit den Tagen. Hier zeigt ein Klickertraining von Müttern und Nachkommen die meisten Trainingswiederholungen. Die Auswertung der Interaktionszeit zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Klickertraining der Mütter oder dem Training der Nachkommen. Allerdings interagieren die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern nach dem Klickertraining am längsten mit dem Experimentator. Die Auswertung vom EPM, OF, SPT, NBT, FST und die Corticosteronbestimmungen ergaben keine Unterschiede, ob die Nachkommen oder die Mütter zuvor trainiert wurden. Lediglich die zurückgelegte Laufstrecke im OF wurde durch das Klickertraining der Mütter signifikant länger als ohne ein Klickertraining der Mütter.

5. DISKUSSION

Das Klickertraining zeigt vielversprechende Auswirkungen auf verschiedene Verhaltens- und physiologische Parameter der Nachkommen. Im Folgenden werden die Effekte des Klickertrainings in Bezug auf die Gewichtszunahme, der Interaktionszeit mit dem Experimentator, die Angst- und Depressions-assoziierte Verhaltensweisen (EPM, OF, SPT, NBT, FST) und die Corticosteronkonzentration diskutiert. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die Häufigkeit und Dauer des Trainings, das Geschlecht der Mäuse sowie die Stammspezifität betrachtet.

5.1 ERSTER VERSUCHSTEIL: 10 MINUTEN KLICKEREINFÜHRUNG MIT EINMALIGEM KLICKERTRAINING DER MÜTTER (PROTOKOLL A) DES AUSZUCHTSTAMMES CRL:CD1(ICR).

Der erste Versuchsteil untersucht, ob ein einmaliges Klickertraining der Mütter des Crl:CD1(ICR) Stammes ausreicht, um positive Effekte auf ihre Nachkommen zu übertragen, sodass ein zusätzliches Klickertraining der Nachkommen überflüssig wird. Im Hinblick auf die Gewichtszunahme beider Geschlechter konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die untrainierten (M+N-) und trainierten Nachkommen (M+N+) von trainierten Müttern zeigen eine vergleichbare Zunahme an Körpergewicht. Auch eine extreme Gewichtszunahme aufgrund der Futterbelohnung konnte widerlegt werden. Aufgrund des hohen Zuckeranteils in der Schokoladencreme bestand die Annahme, dass die trainierten Mäuse im Vergleich zu untrainierten Mäusen ihr Körpergewicht vergrößern würden. Aber auch diese Annahme konnte widerlegt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen genauso viel an Körpergewicht zunehmen wie trainierte Nachkommen kann bestätigt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass ein zusätzliches Training der Nachkommen die Gewichtszunahme nicht beeinflusst. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass alle Mäuse an Gewicht zunehmen und keines der Tiere eine Reduktion ihres Körpergewichtes zeigte. Aufgrund der Gewichtsmessungen können nun Rückschlüsse auf das Wohlbefinden gezogen werden (Do et al., 2020). Wie bereits in 1.4 Positiver Effekt des Klickertrainings erwähnt, können Schmerzen oder Unwohlsein der Auslöser für eine Reduktion des Körpergewichtes sein. Stress kann ebenso zu einer Reduktion des Körpergewichtes führen (Li et al., 2022). Anhand der Auswertung wurde nachgewiesen werden, dass das Klickertraining keine Reduktion des Körpergewichtes der Mäuse verursacht. Das Wohlbefinden in Bezug auf das Körpergewicht wird ebenfalls nicht beeinflusst. Diese identischen Resultate sind ebenso auf die weiblichen Mäuse anwendbar. Weibliche, trainierte Nachkommen nehmen im Vergleich zu

untrainierten Nachkommen tendenziell mehr an Gewicht zu, wenn das Geschlecht berücksichtigt wird. Eine Unterschreitung des Ausgangsgewichts konnte nicht nachgewiesen werden. Bei den männlichen, trainierten Nachkommen kann eine signifikant geringere Gewichtszunahme nachgewiesen werden. Ein zusätzliches Klickertraining der männlichen Nachkommen hat somit eine signifikant geringe Gewichtszunahme zur Folge im Vergleich zu den Nachkommen ohne Klickertraining. Eine Unterschreitung des Ausgangsgewicht konnte nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Begründung wieso die trainierten Männchen weniger an Gewicht im Vergleich zu den untrainierten Männchen zu nehmen, sind die Faktoren Handhabung und Transport. Für das Training wurden die Mäuse immer wieder aus ihrem Käfig in einen Wartekäfig gesetzt. Somit sind die trainierten, männlichen Mäuse häufiger gehandhabt. Außerdem wurde das Training nicht im Haltungsraum durchgeführt wodurch die trainierten Mäuse transportiert wurden. Transport kann bei den Tieren ein Stressindikator sein. Um diesen Aspekt ausschließen zu können, wäre es sinnvoll eine weitere Gruppe in die zukünftigen Untersuchungen mit aufzunehmen. Diese Gruppe sollte Tiere beinhalten, die ebenfalls in den Trainingsraum transportiert werden und für die jeweilige Trainingsdauer von 3,5 Minuten den Käfig explorieren können. Auch hier wird der Tunnel in den 45 Sekunden hineingelegt und in der 15 Sekunden langen Pause wieder herausgenommen. Der einzige Unterschied zu einer trainierten Gruppe wäre das Klickgeräusch. Dadurch kann der Einfluss vom Transport und Handling genauer bestimmt werden.

Ein weiterer Faktor könnte der Einfluss des Geschlechtes sein. Weibliche Mäuse sind aufgrund ihrer Hormone im Allgemeinen stressresilienter. Bei den männlichen Tieren wurden nach dem Zurücksetzen hin und wieder leichte Rankkämpfe (ohne Verletzungen) beobachtet, die zu einer Stressantwort führen und so das Gewicht beeinflussen können.

Der Grund für die geringere Zunahme des Körpergewichtes ist jedoch nicht bekannt und von vielen Faktoren abhängig. Was aber sicher nachgewiesen werden konnte, ist, dass die Mäuse unabhängig vom Geschlecht und vom Training alle an Gewicht zunehmen. Falls das Wohlbefinden der Tiere vermindert wäre, würden die Tiere an Körpergewicht verlieren (Serradas et al., 2022). Eine Verschlechterung des Wohlbefindens bezogen auf die Reduktion des Körpergewichtes, durch das Klickertraining konnte weder bei weiblichen noch bei männlichen Mäusen nachgewiesen werden.

Der Trainingserfolg beider Geschlechter steigt signifikant mit den Trainingstagen. Unter Berücksichtigung des männlichen Geschlechtes kann ebenfalls eine signifikante Steigerung der Trainingserfolge ab dem dritten Trainingstag nachgewiesen werden. Dahingegen zeigten die weiblichen Nachkommen bereits ab dem zweiten Trainingstag eine signifikante Zunahme der Trainingserfolge zeigten. Die Hypothese, dass weibliche, trainierte Nachkommen im

Vergleich zu männlichen, trainierten Nachkommen signifikant höhere Trainingserfolge aufweisen, kann somit bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Klickertraining mit einer Einführungszeit von 10 Minuten bei dem CrI:CD1(ICR) sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Mäusen erfolgreich war, was auf die tägliche Verbesserung zurückzuführen ist.

Die tägliche Verbesserung der Nachkommen ist vermutlich auf das Lernverhalten der Tiere und deren Motivation für die Futterbelohnung zurück zu führen. Diese Versuchsaufbauten waren im Rahmen des hier vorgestellten Projektes jedoch nicht vorgesehen und daher liegen keine Untersuchungsergebnisse hierzu vor. Um diese Behauptung prüfen zu können, wären spezielle Verhaltenstest zur Untersuchung von Gedächtnis und Lernverhalten nötig. Zu diesen Verhaltenstests zählt das Wasserlabyrinth von Morris (Morris Water Maze) (Morris, 1981, Vorhees and Williams, 2006) oder der Objekt-Ort-Erkennung (Object Place Recognition) bzw. Erkennung neuer Objekte (Novel Object Recognition) (Denninger et al., 2018). Im Morris-Wasserlabyrinth (Morris, 1981) wurden Ratten in ein Wasserbecken gesetzt in welchem sie eine unterhalb der Wasseroberfläche verborgene Plattform finden mussten. Sie orientierten sich an visuellen Anhaltspunkten im Raum wie Fenstern, Türen, Regalen und Wänden, um die Plattform unabhängig von ihrer Ausgangsposition immer wieder zu lokalisieren. Der Objekt-Ort Erkennungstest und die Erkennung neuer Objekte basiert auf der Explorationspräferenz der Nager für neue und veränderte Objekte. Dies sind zwei häufig verwendete Tests, um die Funktion und den relativen Zustand bestimmter Gehirnregionen aufzudecken, die am Gedächtnis beteiligt sind. Das Grundprinzip dieser Tests ist es die Tiere zunächst an zwei Objekte zu gewöhnen. In der Testphase wird je nach Testvariante eines der Objekte entweder an einem anderen Ort platziert oder durch ein neues Objekt ersetzt. Die Explorationsdauer der Tiere für das veränderte Objekt wird gemessen, da die Präferenz für das neue Objekt Rückschlüsse auf das Lernverhalten der Tiere zulässt (Denninger et al., 2018).

Die untrainierten Nachkommen (M+N-) beider Geschlechter zeigen im Vergleich zu trainierten Nachkommen (M+N+) die gleiche Interaktionsdauer mit dem Experimentator sowohl vor als auch nach dem Klickertraining. Die Hypothese, dass untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) die gleiche Interaktionszeit mit dem Experimentator vor und nach dem Klickertraining zeigen, konnte bestätigt werden. Die Interaktionszeit mit dem Experimentator verdoppelt sich sowohl bei untrainierten als auch trainierten Nachkommen nach dem Klickertraining. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass auf ein zusätzliches Klickertraining der Nachkommen des CrI:CD1(ICR) Stammes in Bezug auf die Interaktionszeit verzichtet werden kann. Es ist ausreichend, wenn zuvor nur die Mütter trainiert werden. Somit lässt sich die Aussage treffen, dass der positive Effekt des Trainings auf die Nachkommen übertragen werden kann. Um zu prüfen, ob die erhöhte Interaktionszeit auch mit einer

Reduktion des Angstverhaltens verbunden ist, sollen Verhaltenstests durchgeführt werden, die Aufschluss über Angst-assoziiertes Verhalten geben können. Zu diesen Verhaltenstests gehören der erhöhte Pluslabyrinth Test (EPM) und der offene Feld Test (OF), welche im folgenden Kapitel diskutiert werden.

Die Auswertungen des Nestbauverhaltens zeigten einen unterschiedlichen Score zwischen den Geschlechtern. Das zusätzliche Training der Nachkommen beider Geschlechter verbessert das Nestbauverhalten signifikant im Vergleich zu den untrainierten Nachkommen beider Geschlechter. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen (M+N-) beider Geschlechter gleiche oder signifikant bessere Ergebnisse im Nestbauverhalten zeigen, wurde widerlegt. Diese Ergebnisse lassen sich auf die männlichen Nachkommen übertragen jedoch nicht auf die weiblichen Nachkommen. Trainierte, männliche Nachkommen bauen signifikant hochwertigere Nester im Vergleich zu untrainierten Nachkommen. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass sich ein zusätzliches Klickertraining bei den männlichen Nachkommen in Bezug auf das Nestbauverhalten positiv auswirkt. Es wird davon ausgegangen, dass die Komplexität eines Nestes Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Tiere zulässt (Jirkof et al., 2013). Aufgrund dessen führt ein zusätzliches Klickertraining bei den männlichen Nachkommen zu einer Steigerung des Wohlbefindens.

Der Saccharose Präferenztest konnte keine Unterschiede im Konsum der untrainierten und trainierten Nachkommen feststellen. Weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Nachkommen. Der Konsum beträgt bei beiden Geschlechtern um die 85 %. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) das gleiche Depressions-assoziierte Verhalten (Konsumverhalten von der Saccharoselösung) zeigen, wurde bestätigt. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass in Bezug auf den Saccharose Präferenztest auf ein zusätzliches Klickertraining der Nachkommen des Crl:CD1(ICR) Stammes verzichtet werden kann und der positive Effekt des Trainings der Mütter auf ihre Nachkommen übertragen werden kann. Darüber hinaus zeigt das Klickertraining keine Reduzierung des Konsums. Der Konsum liegt durchschnittlich bei ca. 85 %. Erst ab einem Konsum von < 60 % kann von einem anhedonischen Verhalten oder depressiv assoziierten Verhalten bei den Tieren ausgegangen werden und somit von einer Verschlechterung des Wohlbefindens (Liu et al., 2018). Weder das Klickertraining der Mütter noch das Training der Nachkommen führen zu einer Reduktion des Saccharosekonsums und zu einer Verschlechterung des Wohlbefindens.

Der Schwimmtest in Bezug auf die aktive Bewältigungsstrategie zeigte bei beiden Geschlechtern und auch bei den männlichen und weiblichen Nachkommen keinen Unterschied in der Immobilitätsdauer. Die Immobilitätsdauer von untrainierten wie auch trainierten Nachkommen beträgt im Durchschnitt 20 %. Die Hypothese, dass die untrainierten

Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M+N+) die gleiche Immobilitätsdauer zeigen, wurde bestätigt. Die Literatur weist eine Immobilitätsdauer von unbehandelten Mäusen im Bereich von 40 bis 50 % (Leidinger et al., 2017, Du Preez et al., 2020) auf. Im Vergleich zu unseren untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) und trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M+N+) weisen sie eine um die Hälfte kürzere Immobilitätsdauer auf. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass auf ein zusätzliches Klickertraining der Nachkommen verzichtet und der positive Effekt des Klickertrainings auf die Nachkommen übertragen werden kann. Hinzu kommt, dass das Klickertraining die Immobilitätsdauer verkürzt und somit die aktive Bewältigungsstrategie fördert, was auf ein verbessertes Wohlbefinden schließen lässt (Acklin and Gault, 2015).

Bei den männlichen und weiblichen Nachkommen zeigte die ELISA-Auswertung der Corticosteronkonzentration keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern. Es war anzunehmen, dass die Corticosteronkonzentration der weiblichen Nachkommen höher war als die der männlichen Nachkommen. Beide Geschlechter zeigen eine durchschnittliche Corticosteronkonzentration von 5168 (pg/mL)/5,168 (ng/mL). Die männlichen Nachkommen zeigen eine durchschnittliche Corticosteronkonzentration von 3923 (pg/mL)/3,923 (ng/mL). Die weiblichen Nachkommen zeigen eine durchschnittliche Corticosteronkonzentration von 6957 (pg/mL)/6,967 (ng/mL). Alle diese Corticosteronkonzentrationen weisen im Vergleich zu den in der Literatur veröffentlichten Werten deutlich niedrigere Werte auf (Marchette et al., 2018). Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen (M+N-) gleiche Ergebnisse wie trainierte Nachkommen (M+N+) erzielen, konnte bestätigt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass es ausreicht nur die Mütter zu trainieren. Somit zeigt sich, dass das Klickertraining der Mütter einen positiven Effekt auf deren Nachkommen hat. Das Klickertraining kann außerdem die Corticosteronkonzentration im Vergleich zu den Daten aus der Literatur (Marchette et al., 2018) reduzieren und trägt somit zu einer Verbesserung des Wohlbefindens bei.

Das Klickertraining mit einer Einführungszeit von 10 Minuten trägt bei männlichen und bei den weiblichen Nachkommen des Crl:CD1(ICR) Stammes zu einer Verbesserung des Wohlbefindens bei. Ein Klickertraining der Mütter ist ausreichend und kann den positiven Effekt auf deren Nachkommen übertragen. In Einzelfällen ist die Berücksichtigung des Geschlechtes zu beachten. Zumindest auf der Grundlage der bisher ausgewerteten Verhaltenstests. Um weiter Rückschlüsse auf deren Wohlbefinden schließen zu können, soll im folgenden Versuchsteil das Angst-assoziierte Verhalten der Mäuse mittels offenem Feld Test und dem erhöhten Pluslabyrinth Test zusätzlich untersucht werden. Das bisherige Klickerprotokoll hat mit einer Klickereinführungszeit von 10 Minuten noch eine relativ lange Dauer, wodurch

maximal 24 Tiere an einem Tag trainiert werden können. Es wird geprüft, ob eine Verkürzung der Einführungszeit auf 5 Minuten ähnliche Trainingserfolge erzielt wie die 10-minütige Einführungszeit. Dadurch könnte das Protokoll effizienter und nutzerfreundlicher gestaltet werden.

5.2 ZWEITER VERSUCHSTEIL: 5 MINUTEN KLICKEREINFÜHRUNG MIT EINMALIGEM KLICKERTRAINING DER MÜTTER (PROTOKOLL A) DES AUSZUCHTSTAMMES CRL:CD1(ICR).

Um zu prüfen, ob das Klickertraining einen Einfluss auf das Angst-assoziierte Verhalten der Nachkommen hat, wurden Verhaltenstests ausgewertet, die das angsthafliche Verhalten der Mäuse bewerten. Zudem wurde untersucht, ob ein Klickertraining der Mütter (M+N-) im Vergleich zum Training der Nachkommen (M-N+) einen größeren positiven Effekt hat. Um einen Effekt des Klickertrainings nachweisen zu können, wurden untrainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) ebenfalls in die Auswertung mit einbezogen. Im Vergleich zu dem vorherigen Versuch kommt hinzu, dass die Mäuse eine Klickereinführungszeit von 5 Minuten anstatt wie bisher von 10 Minuten hatten.

Alle Mäuse beider Geschlechter nehmen während des Trainings an Gewicht zu. Eine Unterschreitung des Ausgangsgewichts konnte nicht nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen keine signifikante Reduktion des Körpergewichtes zeigen, konnte auch hier bestätigt werden. Abhängig von dem Geschlecht konnte nachgewiesen werden, dass sowohl männliche als auch weibliche Nachkommen während des Trainings an Gewicht zu nehmen. Das Körpergewicht wird als Indikator für das Wohlbefinden genutzt. Eine Abnahme ist ein Anzeichen für eine Verschlechterung des Wohlbefindens wohingegen eine Zunahme ein Anzeichen für eine Verbesserung des Wohlbefindens ist (Do et al., 2020, Li et al., 2022). Das Klickertraining hat keine Reduktion des Gewichtes zur Folge und somit ist das Wohlbefinden in Bezug auf das Körpergewicht nicht negativ beeinflusst. Gegenteilig wurde bewiesen, dass trainierte Nachkommen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen signifikant mehr an Gewicht zunehmen. Das Training der Mütter bewirkt lediglich eine geringe Gewichtszunahme im Vergleich zu dem Training der Nachkommen. Aufgrund der geringen Tierzahl konnte die signifikant größere Gewichtszunahme nur bei beiden Geschlechtern jedoch nicht getrennt für die männlichen und weiblichen Nachkommen nachgewiesen werden. Die Tendenz zeigt aber, dass das Training der männlichen und weiblichen Nachkommen zu einer stärkeren Gewichtszunahme führt im Vergleich zu dem Training der Mütter. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Nachkommen sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Mäusen tendenziell eine größere Gewichtszunahme im Vergleich zum

Training der Mütter zur Folge hat. Das Klickertraining der Nachkommen wie auch das der Mütter führen zu keiner Verschlechterung des Wohlbefindens in Bezug auf das Körpergewicht.

Die Auswertung zeigt, dass die Trainingshäufigkeiten sowohl bei den trainierten Nachkommen (M+N+) als auch bei den untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) ab dem zweiten Tag signifikant verbessert wurden. Jedoch gibt es keine Unterschiede, ob die Mütter zuvor trainiert wurden oder nicht. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) die gleiche Anzahl an Trainingserfolgen wie trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) zeigen, kann somit bestätigt werden. Zwar sind die Trainingserfolge tendenziell höher bei trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) aber nicht signifikant im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+). Das Training der Mütter hat somit keinen signifikanten Effekt auf die Trainingshäufigkeiten der Nachkommen beider Geschlechter. Das Training der Nachkommen alleine führt zu einer signifikanten Verbesserung der Trainingserfolge ab dem zweiten Trainingstag. Diese Ergebnisse lassen sich auch auf die männlichen Nachkommen übertragen. Es gibt keine Unterschiede in den Trainingserfolgen, ob die Mütter zuvor trainiert wurden oder nicht. Die männlichen, trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+), verringern bereits ab dem dritten Tag ihre Anzahl an Trainingshäufigkeiten. Die männlichen, untrainierten Nachkommen (M+N-) verringern ab dem vierten Trainingstag ihre Erfolge. Ein möglicher Grund hierfür könnte die geringere Motivation der bekannten Futterbelohnung sein. Eine andere Möglichkeit wäre die Anpassung des Trainingsprotokolls für die männlichen Nachkommen. Diese Anpassung könnte eine Unterbrechung des Trainings am dritten Tag beinhalten. Aber grundsätzlich gilt bei dem Klickertraining, dass die Konditionierung entweder erfolgreich oder nicht erfolgreich ist. Darauf baut das Prinzip des Klickertrainings auf. Entweder die Tiere werden auf den Klick konditioniert oder die Konditionierung war nicht erfolgreich. Die Verbesserungen vom ersten Trainingstag auf den zweiten Trainingstag sind immer entscheidend. Diese zeigen, ob die Konditionierung auf den Klick erfolgreich war. Abweichungen davon können immer auftreten z. B. durch eine andere Mauslieferung, eine andere Jahreszeit, Baulärm oder einen Tierpflegerwechsel. Bei den weiblichen, trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) steigt die Trainingshäufigkeit bis zum dritten Tag an und ist signifikant größer im Vergleich zu den trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern. Zwar nehmen die Trainingserfolge der weiblichen, trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) am vierten Tag ab, sind aber dennoch größer im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M+N-). Die Abnahme ab Tag drei bei den männlichen und weiblichen, trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) ist auf die reduzierte Klickereinführung zurückzuführen. Werden die Trainingserfolge der 5-minütigen mit der 10-minütigen Klickereinführungszeit verglichen, fällt auf, dass die Anzahl der

Trainingserfolge, obwohl sie sinken, dennoch größer sind (Abbildung 42). Das betrifft beide Geschlechter sowohl die männlichen als auch die weiblichen Nachkommen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Hypothese bestätigt werden, dass das Klickertraining mit einer Einführungszeit von 5 Minuten signifikant mehr Trainingserfolge bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm erzielt im Vergleich zu einer 10-minütigen Einführungszeit.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das Klickertraining mit einer verkürzten Einführungszeit von 5 Minuten ebenso effektiv bei dem Crl:CD1(ICR) Mausstamm ist wie die 10-minütige Einführungszeit. Die Mäuse lernen den Klick mit anschließender Belohnung zu assoziieren. Diese Assoziation wird durch eine kontinuierliche Steigerung der Trainingserfolge bis zum dritten Tag bestätigt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die kürzere Einführungszeit keinen negativen Effekt auf die Lernfähigkeit und das konditionierte Verhalten der Mäuse hat.

Die Interaktionszeit mit dem Experimentator vor dem Klickertraining wird durch das Training der Mütter nicht beeinflusst. Dies war zu erwarten, da die Nachkommen außer dem Training der Mütter keinen anderen Einfluss gehabt hatten. Anhand dieser Daten wurde gezeigt, dass der Einfluss des Trainings der Mütter nicht ausreicht, um einen Unterschied in der Interaktionszeit mit dem Experimentator vor dem Training der Nachkommen zu bewirken. Lediglich die männlichen Nachkommen von trainierten Müttern zeigen eine Tendenz zur längeren Interaktionszeit als die Nachkommen von untrainierten Müttern. Bei den weiblichen Nachkommen verhält es sich gegensätzlich. Die Nachkommen von untrainierten Müttern interagieren länger mit dem Experimentator als die Nachkommen von trainierten Müttern. Dies verdeutlicht zudem, dass die Tiere im Allgemeinen positive Erfahrungen in der Interaktion mit dem Menschen sammeln. Die Interaktionszeit mit dem Experimentator nach dem Klickertraining wird durch das Training der Nachkommen signifikant länger als durch das Training der Mütter. Unter Berücksichtigung beider Geschlechter steigert das Training der Nachkommen signifikant die Interaktionszeit mit dem Experimentator. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen beider Geschlechter von trainierten Müttern (M+N-) eine längere Interaktionszeit im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) aufweisen, konnte nicht bestätigt werden. Genauso wurde die Hypothese widerlegt, dass trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) eine gleiche oder signifikant längere Interaktionszeit als trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) aufweisen. Die Hypothese, dass die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) die gleiche Interaktionszeit wie die untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) hatten, wurde bestätigt. Auch die Hypothese das trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine signifikant längere Interaktionszeit aufweisen, kann bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass unter Berücksichtigung beider Geschlechter die längste Interaktionszeit mit dem Experimentator durch das Training der Mütter sowie der Nachkommen erzielt wird. Darüber hinaus erhöht das Klickertraining signifikant die Interaktionszeit zwischen Maus und Experimentator, was den positiven Einfluss des Klickertrainings auf die Interaktion bestätigt.

Die männlichen Nachkommen zeigen eine signifikant längere Interaktionszeit, wenn zuvor die Mütter trainiert wurden. Sowohl untrainierte (M+N-) als auch trainierte (M+N+) Nachkommen von trainierten Müttern zeigen im Vergleich zu den trainierten Nachkommen untrainierter Mütter (M-N+) eine deutlich längere Interaktionszeit. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) gleich lang oder signifikant länger interagieren im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), kann bestätigt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) gleich lang interagieren wie trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+), konnte nicht bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass das Klickertraining der Mütter eine längere Interaktionszeit der männlichen Nachkommen mit dem Experimentator bewirkt, als wenn die Nachkommen selbst trainiert werden. Bei einer aktuellen Einführungszeit von 5 Minuten pro Tier und einer ersten Trainingseinheit von 3,5 Minuten ergibt sich eine Gesamtzeit von 8,5 Minuten pro Tier. Bei 6 männlichen Nachkommen ergibt dies eine reine Trainingszeit von insgesamt 51 Minuten. Diese Ergebnisse zeigen, dass auf ein separates Klickertraining der Nachkommen verzichtet werden kann, sodass anstelle von 6 Tieren nur noch das Muttertier trainiert werden muss. Dies führt in diesem Beispiel zu einer Zeitersparnis von 83 % und bietet eine nutzerfreundlichere sowie zeitsparende Anwendung bei den männlichen Nachkommen mit gleich guten Resultaten als wenn zusätzlich noch die Nachkommen trainiert werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass bei den männlichen Nachkommen die längste Interaktionszeit mit dem Experimentator durch das Training der Mütter und das Training der Nachkommen erzielt wird. Dennoch profitieren die männlichen Nachkommen auch von einem Training der Mütter ohne zusätzlich die Nachkommen zu trainieren. Auf ein zusätzliches Training der Nachkommen kann somit verzichtet werden. Weibliche Nachkommen profitieren hingegen von ihrem eigenen Training in Bezug auf die Interaktionszeit. Sie zeigen eine signifikant längere Interaktion mit dem Experimentator, wenn sie selber trainiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass weibliche Nachkommen stärker von ihrem eigenen Training profitieren als von dem Training ihrer Mütter. Dennoch interagieren die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern am längsten mit dem Experimentator. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) die gleiche oder signifikant eine längere Interaktionszeit zeigen, im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern

(M-N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) kann nicht bestätigt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass bei den weiblichen Nachkommen die längste Interaktionszeit mit dem Experimentator durch das Training der Mütter und das Training der Nachkommen erzielt wird. Dennoch profitieren die weiblichen Nachkommen von ihrem eigenen Training und auf ein zusätzliches Training der Mütter kann somit verzichtet werden.

Ein Vergleich der Interaktionszeiten vor und nach dem Training zeigt, dass sich die Interaktionszeit fast verdoppelt. Das Klickertraining verlängert die Interaktionszeit. Eine längere Interaktionszeit führt zu einer Verringerung des angsthellen Verhaltens, das durch eine längere Aufenthaltsdauer im Zentrum des offenen Feld Tests und in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths bestimmt wird (Gouveia und Hurst, 2013; Gouveia und Hurst, 2019). Ein reduziertes Angst-assoziiertes Verhalten ermöglicht es den Mäusen ihrem natürlichen explorativen Verhalten und Fressverhalten besser nachzugehen (Fu et al., 2023). Daraus lässt sich ableiten, dass durch das Klickertraining eine Verbesserung des Wohlbefindens der Mäuse erzielt wird.

Das Angst-assoziierte Verhalten soll durch das Klickertraining reduziert werden. Um das zu bestätigen, wurden trainierte und untrainierte Nachkommen verschiedenen Verhaltenstest unterzogen. Der Vergleich der einzelnen Gruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Aufenthaltsdauer in den offenen und geschlossenen Armen, im Zentrum und in der Gesamtlaufstrecke des erhöhten Pluslabyrinths. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) eine längere Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths zeigen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) kann nicht bestätigt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) eine längere Gesamtlaufstrecke im EPM aufweisen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) kann nicht bestätigt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Nachkommen beider Geschlechter und der Mütter keinen Einfluss auf das Angst-assoziierte Verhalten in Bezug auf die Ergebnisse des EPMS hat. Auch unter Berücksichtigung des Geschlechtes konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Die Auswertungen der Daten vom OF zeigen ähnliche Ergebnisse. Es konnte kein Unterschied beider Geschlechter in der Aufenthaltsdauer im Zentrum und in der Peripherie nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung des Geschlechtes führt das Klickertraining der Mütter von den

männlichen Nachkommen zu einer signifikant kürzeren Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs im Vergleich zu dem Training der Nachkommen. Unter Berücksichtigung des weiblichen Geschlechtes wurde kein Unterschied in der Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs festgestellt. Die Gesamtlaufstrecke (beider Geschlechter) bei den trainierten Nachkommen ist im OF signifikant länger im Vergleich zu den untrainierten Nachkommen. Das vorherige Training der Mütter hat keinen Einfluss auf die Gesamtlaufstrecke der Nachkommen. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) eine längere Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) zeigen, kann nicht bestätigt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) eine längere Gesamtlaufstrecke im OF aufweisen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) sowie trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) kann nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining unabhängig vom Geschlecht das Angst-assoziierte Verhalten der Nachkommen im OF weder reduziert noch verstärkt. Geschlechtsspezifische Analysen ergaben, dass das Klickertraining der Mütter die Aufenthaltsdauer der männlichen Nachkommen im Zentrum des OFs verringert, was darauf hindeutet, dass das Training der Mütter das Angst-assoziierte Verhalten bei den männlichen Nachkommen verstärken könnte. Im Gegensatz dazu zeigt die Auswertung des Interaktionstest eine Verlängerung der Interaktionsdauer mit dem Experimentator, wenn zuvor die Mütter noch trainiert werden. Dies deutet auf eine positive Beeinflussung des sozialen Verhaltens hin, welches erste Anzeichen für eine Reduzierung des Angst-assoziierten Verhaltens sind. Die Auswertung der Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMS zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den männlichen Gruppen. Dies sind alles Anzeichen für eine Reduzierung des Angst-assoziierten Verhaltens der männlichen Nachkommen durch ein zusätzliches Training der Mütter. Ein Grund für die Erhöhung des Angst-assoziierten Verhaltens im OF aber nicht im EPM der männlichen Nachkommen durch ein Training der Mütter ist nicht bekannt. Obwohl beide Verhaltenstests das Angst-assoziierten Verhaltens bewerten sollen, konnte in der Literatur ebenfalls keine übereinstimmenden Ergebnisse nachgewiesen werden (Figueiredo Cerqueira et al., 2023). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die männlichen Nachkommen im OF in eine ihnen neue und unbekannte Umgebung gesetzt werden, was möglicherweise das Angst-assoziierte Verhalten verstärken könnte. Um genauere Erkenntnisse zu gewinnen, wäre es sinnvoll, die Verweildauer der männlichen Nachkommen in der Peripherie des OFs genauer zu untersuchen. Bisher wurden keine Unterschiede in der Aufenthaltsdauer in der Peripherie unter Berücksichtigung beider Geschlechter festgestellt. Das Klickertraining der Nachkommen beider Geschlechter hingegen

verlängert signifikant die Gesamtlaufstrecke im OF im Vergleich zu dem Training der Mütter. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) eine längere Gesamtlaufstrecke zurücklegen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) konnte nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Nachkommen einen Einfluss auf die Gesamtlaufstrecke hat. Durch die längere zurückgelegte Strecke lassen sich Rückschlüsse auf ein längeres exploratives Verhalten ziehen. Ein längeres exploratives Verhalten führt zu einem besseren psychischen Zustand, da es den Mäusen ermöglicht wird, ihre natürliche Neugier auszuleben und Stress abzubauen (Acklin and Gault, 2015), wodurch ihr Wohlbefinden verbessert wird. Ein möglicher Grund warum das Angst-assoziierte Verhalten durch das Klickertraining nicht beeinflusst wird, könnte darin liegen, dass die Mäuse keinem aversiven Einfluss ausgesetzt wurden, wie etwa der Handhabung am Schwanz (Ghosal et al., 2015, Du Preez et al., 2020) oder anderer stressverursachender Manipulationen [(z. B. Injektionen) Can et al., 2011]. Des Weiteren handelt es sich in diesem Versuch um den Crl:CD1(ICR) Stamm, bei dem ein reduziertes Angstverhalten nachgewiesen wurde, im Vergleich zu dem C57BL/6 Stamm (Marchette et al., 2018). Auch das Alter der CD1 Mäuse kann hier einen Einfluss haben. Junge CD1 Mäuse bis zu 24 Wochen sind aktiver, explorativer und zeigen weniger Angst-assoziierte Verhaltensweisen (Figueiredo Cerqueira et al., 2023).

Die Auswertung des Nestbau Scores ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (beide Geschlechter, Männchen und Weibchen). Die Hypothese, dass das gezielte Klickertraining der Mütter ohne deren Nachkommen zu trainieren (M+N-) im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) signifikant einen höheren Nestbau Score aufweisen, wurden nicht bestätigt. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Nachkommen und der Mütter keinen Einfluss auf den Nestbau Score hat und somit das Wohlbefinden der Nachkommen nicht verschlechtert. Es ist lediglich eine Tendenz zu erkennen, dass das Training der Mütter zu einem höheren Nestbau Score der Nachkommen beider Geschlechter beiträgt. Würde das Klickertraining zu einer Verschlechterung des Wohlbefindens der Nachkommen beitragen, müssten die trainierten Gruppen (M-N+, M+N-, M+N+) einen kleineren Nestbau Score aufweisen, im Vergleich zu den untrainierten Nachkommen (M-N-). Dies ist nicht der Fall und somit hat das Klickertraining keine Verschlechterung des Wohlbefindens zur Folge unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Nestbauverhaltens. Die Übertragung einer Verbesserung des Wohlbefindens auf die Nachkommen von trainierten Müttern kann somit aber auch nicht bestätigt werden. Im vorherigen Versuchsteil konnte

jedoch ein signifikanter Unterschied durch das Training der Nachkommen festgestellt werden. Ein möglicher Grund, wieso das bei der verkürzten Einführung nicht der Fall ist, könnte die Anzahl der Tiere sein, welche wesentlich geringer war. Dennoch konnte eine Tendenz nachgewiesen werden, die durch eine Vergrößerung der Tierzahl vermutlich signifikant bestätigt werden könnte.

Die Untersuchungen des Saccharose Präferenz Testes ergaben keine Unterschiede weder durch das Klickertraining der Nachkommen noch durch das der Mütter. Auch unter Berücksichtigung des Geschlechtes konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Hypothesen, dass das gezielte Klickertraining der Mütter ohne deren Nachkommen zu trainieren (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) signifikant eine größere Aufnahme an Saccharoselösung zeigt, wurde nicht bestätigt. Hinzukommt, dass die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern keine größere Saacharoseaufnahme zeigen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-). Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Mütter und das Training der Nachkommen keine Auswirkungen auf den Saccharosekonsum haben. Die Saccharose Präferenz ist zwar durch das Klickertraining der Mütter im Vergleich zur Literatur reduziert und liegt bei 60,2 %, sie unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Präferenz der untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), welche bei 77,3 % liegt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Klickertraining der Mütter keinen signifikanten Einfluss auf das Belohnungs-assoziierte Verhalten der Nachkommen hat, obwohl eine tendenzielle Reduktion der Saccharose Präferenz beobachtet wurde. Von einem anhedonischem Verhalten wird erst dann gesprochen, wenn die Präferenz unter 60 % liegt (Liu et al., 2018). Eine Unterschreitung der Präferenz von 60 % ist somit nicht erreicht. Unter Berücksichtigung des männlichen Geschlechtes konnte eine reduzierte Saccharose Präferenz nachgewiesen werden. Das Training der Mütter (Abbildung 50 B: M+N- 55 %) und das Training der Nachkommen (Abbildung 50 B: M-N+ 58,5 %) führten zu einer Reduktion der Saccharose Präferenz. Üblicherweise wird eine Präferenzunterschreitung von 60 bis 75% als Indikator für anhedonisches Verhalten interpretiert (Liu et al., 2018). Da die Präferenzwerte der männlichen Nachkommen nicht signifikant von den untrainierten Nachkommen untrainierter Mütter (M-N-) abweichen, wird nicht von einem anhedonischem Verhalten ausgegangen. Eine Unterschreitung der Saccharose Präferenz bei den weiblichen Nachkommen konnte nicht nachgewiesen werden, lediglich eine Tendenz, dass das Klickertraining der Nachkommen die Präferenz reduziert. Ein weiterer Grund wieso es keinen Unterschied innerhalb der Gruppen gibt, könnte daran liegen, dass die untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern keinem Stressreiz ausgesetzt waren. Ohne vorherige Stressinduktion liegt die Sacharose Präferenz bei 80 % was darauf hinweist, dass die Tiere ein normales Belohnungsverhalten

zeigen und keine Anzeichen von Anhedonie aufweisen. Der Stressreiz muss entsprechend hoch sein, um eine messbare Auswirkung auf das Verhalten nachweisen zu können. Nur nach einer starken Stressindikation können Veränderungen in der Saccharose Präferenz nachgewiesen werden wie z. B. bei psychosozialen Stress (Einzelhaltung) (Du Preez et al., 2020). In unserem Versuch ist es nicht möglich, die untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern direkt mit Mäusen zu vergleichen, die psychosozialen Stress ausgesetzt waren, da so eine Gruppe in diesem Projekt nicht berücksichtigt wurde. Unsere Daten zeigen, dass das Klickertraining keine Steigerung der Saccharose Präferenz zur Folge hat. Eine interessante Fragestellung wäre es, den Saccharosekonsum der trainierten Nachkommen nach einer Stressindikation zu untersuchen. Es wäre daher sinnvoll eine Gruppe, die einem Stressreiz ausgesetzt wurde in die zukünftigen Gruppen zu integrieren. Die Wahrscheinlichkeit, den Einfluss des Klickertrainings auf den Saccharosekonsum nachzuweisen, würde steigen. Hierbei sollte geprüft werden, ob das Klickertraining in der Lage ist den Stressreiz zu kompensieren, was sich durch den Konsum von zuckerhaltigem Wasser zeigen könnte.

Nicht nur die Bestimmung der Saccharose Präferenz kann Depressions-assoziiertes Verhalten detektieren, sondern auch der Schwimmtest. Die Hypothese, dass das gezielte Klickertraining der Mütter ohne die Nachkommen zu trainieren (M+N-) im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) signifikant eine kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest (FST) zeigt, kann widerlegt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Mütter wie auch das der Nachkommen beider Geschlechter keinen Einfluss auf das Depressions-assoziierte Verhalten in Bezug auf die Bewältigungsstrategie der Nachkommen hat. Auch unter Berücksichtigung des weiblichen und männlichen Geschlechtes konnte kein Unterschied nachgewiesen werden. Die Gründe, wieso kein Einfluss des Trainings auf dieses Verhalten nachzuweisen ist, könnte vielfältig sein. Einer davon kann sein, dass die Immobilitätsdauer der nicht trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) mit 7,4 % (Abbildung 50) bereits relativ niedrig ist. Die Literatur weist eine Immobilitätsdauer von unbehandelten Mäusen im Bereich von 40 bis 50 % (Leidinger et al., 2017, Du Preez et al., 2020) auf. Dahingegen zeigten die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine tendenziell kürzere Immobilitätsdauer im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-), sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Nachkommen. Um diese Daten zu prüfen, sollte über eine Erhöhung der Tierzahl diskutiert werden. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Nachkommen keiner

verhaltensverändernden Stressindikation ausgesetzt waren und alle tierfreundlich nur mit der Hand und nicht am Schwanz gehandhabt wurden. Somit ist ein Effekt des Klickertrainings nicht nachweisbar, da es zu keiner Verschlechterung und somit zu einer Reduktion der Saccharose Referenz kam. Dafür wäre eine Gruppe an Mäusen ratsam, die einem Stressreiz ausgesetzt werden. Es wurde nachgewiesen, dass eine Stressindikation (Injektion) zu einer erhöhten Immobilitätsdauer führt (Au - Can et al., 2012). Der CD1 Stamm weist eine Immobilitätsdauer von über 150 Sekunden auf (Can et al., 2011). Umgerechnet ergibt das bei einer Gesamtdauer von 360 Sekunden (6 Minuten) eine Immobilitätsdauer von knapp 41 %. Die längste Immobilitätsdauer die wir nachweisen konnten, betrug 10,1 % bei den weiblichen untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Mütter als auch das der Nachkommen tendenziell die aktive Bewältigungsstrategie fördert. Aktive Bewältigungsstrategien, wie beispielsweise das Schwimmen oder exploratives Verhalten (Acklin and Gault, 2015), ermöglichen Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Mäuse. Ein gesteigertes Wohlbefinden der Tiere wird beobachtet, wenn sie solche aktiven Bewältigungsstrategien anwenden. Die reduzierte Immobilitätsdauer, die durch das Klickertraining beobachtet wurde, lässt Rückschlüsse auf ein verbessertes Wohlbefinden der Mäuse zu. Das Klickertraining fördert die aktive Bewältigungsstrategie und trägt dadurch zu einer Steigerung des Wohlbefindens der Nachkommen bei.

Die Bestimmung der Corticosteronkonzentration, wird genutzt um das Wohlbefinden sowie den Schweregrad der Belastung von Mäusen durch Experimente zu evaluieren (Leenaars et al., 2020). Die Ergebnisse der Corticosteronauswertung zeigen eine signifikante höhere Plasmakonzentration beider Geschlechter durch das Klickertraining der Mütter (Abbildung 52: M+N- und M+N+). Die weiblichen Nachkommen zeigen signifikant höhere Corticosteronkonzentrationen nach dem Training ihrer Mütter sowie ihrem eigenen Training (M+N+). Bei den männlichen Nachkommen wurde festgestellt, dass das Training der Nachkommen die Corticosteronkonzentration im Plasma signifikant reduziert. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) und trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) eine geringere Corticosteronkonzentration zeigen, wurde nicht bestätigt. Die Hypothese, dass die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) eine geringere Corticosteronkonzentration zeigen, wurde nicht bestätigt. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Training der Mütter die Corticosteronkonzentration der Nachkommen unter Berücksichtigung beider Geschlechter erhöht. Bei den weiblichen Nachkommen führt sowohl das Klickertraining der Mütter als auch das eigene Training der Nachkommen zu einer

Erhöhung der Corticosteronkonzentration. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei den männlichen Nachkommen eine Reduktion der Corticosteronkonzentration ausschließlich durch ihr eigenes Training. Die höhere Corticosteronkonzentration bei den weiblichen Nachkommen im Vergleich zu den männlichen Nachkommen entsprach den Erwartungen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Hormone ist die Corticosteronkonzentration bei den weiblichen Tieren generell höher als bei den männlichen (Atkinson and Waddell, 1997). Die Ergebnisse legen nahe, dass das Klickertraining der Mütter von den weiblichen Nachkommen die Corticosteronkonzentration erhöht. In der Literatur wird eine erhöhte Corticosteronkonzentration nach einer Stressindikation als Indikator für eine Verschlechterung des Wohlbefindens gewertet (Tsuchimine et al., 2020). Eine Erhöhung der Corticosteronkonzentration kann jedoch auch durch Erregung infolge einer erwarteten Belohnung hervorgerufen werden (Ralph and Tilbrook, 2016, Ratuski et al., 2024). Folglich könnte das Klickertraining gefolgt von der Belohnung zu einer Erhöhung der Corticosteronkonzentration führen. Dies könnte als ein Hinweis auf eine Verbesserung des Wohlbefindens interpretiert werden, anstatt auf eine Verschlechterung. Ein Vergleich der Werte aus dieser Studie mit Werten aus der Literatur zeigt, dass das Klickertraining zwar zu einer Erhöhung der Corticosteronkonzentration führt, diese jedoch deutlich unter den Konzentrationen liegt, die nach einem Fixierungs- oder Injektionsstress beobachtet werden (Marchette et al., 2018, Du Preez et al., 2020). Selbst die Messung im Ruhezustand ist noch deutlich höher im Vergleich zu den Werten nach dem Klickertraining (Marchette et al., 2018). Nicht zu vergessen, dass die Blutproben nach dem Schwimmtest entnommen wurden. Hier zeigt die Literatur Corticosteronkonzentrationen um die 100 ng/mL (Du Preez et al., 2020), wohingegen diese Studie maximale Werte von etwa 7 ng/mL nachweisen konnte. Um die Hypothese zu prüfen, dass positiver Erwartungsstress einen Anstieg des Corticosteronspiegels verursacht ohne dabei das Wohlbefinden negativ zu beeinflussen, sind zusätzliche Experimente erforderlich. Ein möglicher erster Ansatz wäre, die Corticosteronkonzentration im Blut nach der Futterbelohnung zu messen. Bei den männlichen, trainierten Nachkommen zeigen die Ergebnisse eine Reduzierung der Corticosteronwerte. Folglich könnte das Klickertraining bei den Nachkommen die Konzentration senken und würde somit zu einer Stressreduktion beitragen.

Bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm kann die Einführungszeit des Klickertrainings von bisher 10 Minuten auf 5 Minuten reduziert werden. Es ist nicht mehr nötig die Klickereinführung bei 10 Minuten pro Tier zu belassen, sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Mäusen. Der positive Effekt des Klickertrainings kann leider nicht von der Mutter auf ihre Nachkommen des Crl:CD1(ICR) Stammes übertragen werden. Vermutlich ist die Zeitspanne zwischen dem Training der Mutter und dem Training der Nachkomme zu lang (diese beträgt 11 Wochen).

Dennoch zeigt ein doppeltes Klickertraining von Mutter und Nachkommen vielversprechende Ergebnisse. Um zu prüfen, ob das Klickertraining der Mütter wirklich keinen Effekt auf die Nachkommen hat, wurde eine weitere Hypothese aufgestellt. Es wurde geprüft, ob sich das Angst- sowie Depressions-assoziierte Verhalten der Nachkommen von trainierten Müttern verringert, wenn das Klickertraining der Mütter nach der Geburt der Nachkommen (P14) wiederholt wird. Somit würde die Zeitspanne zwischen dem Training der Mutter und dem Training der Nachkommen verkürzt. Anstatt der bisher 11 Wochen waren es dann nur noch 5 Wochen. Daher werden die Mütter im folgenden Versuchsteil zwei Mal, anstatt nur einmal, trainiert.

5.3 DRITTER VERSUCHSTEIL: 5 MINUTEN KLICKEREINFÜHRUNG MIT ZWEI TRAININGSEINHEITEN DER MÜTTER (PROTOKOLL B) DES AUSZUCHTSTAMMES CRL:CD1(ICR)

In dem dritten Versuchsteil wird die Frage untersucht, ob ein doppeltes Training bzw. eine Trainingswiederholung der Mütter das Verhalten ihrer Nachkommen beeinflussen kann. Die ersten Daten die erhoben wurden, betreffen die Messung des Körpergewichtes. Während des Klickertrainings nehmen alle Mäuse unabhängig von ihrem Geschlecht an Gewicht zu. Eine Unterschreitung des Ausgangsgewicht konnte nicht nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen keine signifikante Reduktion des Körpergewichtes zeigen, konnte bestätigt werden. Abhängig von dem Geschlecht konnte nachgewiesen werden, dass sowohl männliche als auch weibliche Nachkommen während dem Training an Gewicht zu nehmen. Das Training der männlichen Nachkommen führt im Vergleich zum Training der Mütter zu einer signifikant höheren Gewichtszunahme. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das Klickertraining einen direkten Einfluss auf das Körpergewicht der trainierten Nachkommen hat, während das Training der Mütter diesen Effekt nicht in gleichem Maße hervorruft. Wie zuvor bereits erwähnt wird das Körpergewicht als Indikator für das Wohlbefinden genutzt (Serradas et al., 2022). Eine Abnahme des Körpergewichtes wird mit einer Verschlechterung des Wohlbefindens in Verbindung gebracht, während eine Zunahme mit einer Verbesserung des Wohlbefindens in Verbindung gebracht wird (Do et al., 2020, Li et al., 2022). Das Klickertraining hat keine Reduktion des Gewichtes zur Folge und somit ist das Wohlbefinden in Bezug auf das Körpergewicht nicht negativ beeinflusst. Gegenteilig wurde bewiesen, dass trainierte Nachkommen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen mehr an Gewicht zunehmen. Das Training der Mütter bewirkt lediglich eine geringe Gewichtszunahme im Vergleich zu dem Training der Nachkommen. Eine signifikante Zunahme des Körpergewichtes nach dem

Training der Nachkommen konnte lediglich bei den männlichen nicht aber bei den weiblichen Nachkommen festgestellt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Nachkommen wie auch das der Mütter zu keiner Verschlechterung des Wohlbefindens in Bezug auf das Körpergewicht führt.

Die Auswertung des Trainingsverhaltens beider Geschlechter ergab, dass es während des Klickertrainings zu keiner signifikanten Steigerung der Trainingserfolge kam. Zwar zeigten die Nachkommen eine tendenzielle Verbesserung im Verlauf des Trainings, jedoch konnte diese nicht statistisch nachgewiesen werden. Die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) zeigen im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) tendenziell mehr Trainingserfolge. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Training zwar leichte Verhaltensverbesserungen bewirken kann, diese jedoch nicht ausreichend ausgeprägt sind, um als signifikant betrachtet zu werden. Unter Berücksichtigung des männlichen Geschlechtes konnte eine tendenzielle Zunahme der Trainingserfolge bei trainierten Nachkommen von trainierten und untrainierten Müttern nachgewiesen werden. Die trainierten, weiblichen Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) verringern ihre Trainingserfolge im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+). Die Hypothese, dass die trainierten Nachkommen von zweimal trainierten Müttern (Protokoll B: M+N+) im Vergleich zu den Nachkommen von Müttern, die nur einmal trainiert wurden (Protokoll A: M+N+) signifikant mehr Trainingserfolge zeigen, konnte nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Nachkommen sowie das zweifache Training der Mütter keinen Einfluss auf den Trainingserfolg haben. Der Grund, wieso es keine signifikante Zunahme der Trainingserfolge beider Geschlechter gab, ist unbekannt und wurde auch nicht erwartet. In vorherigen Klickertrainingseinheiten wurde bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm eine signifikante Zunahme nachgewiesen. Bei männlichen wie auch bei weiblichen Nachkommen. Es wird vermutet, dass Umweltfaktoren wie der Versuchsraum, die Temperatur, die Lichtverhältnisse, die Geräusche oder die Wissenschaftler selber einen Einfluss haben könnten. Der Zeitraum von der Geburt der Nachkommen bis zum Start des Klickertrainings beträgt 7 Wochen. In dieser Zeit können zahlreiche Umweltfaktoren das Verhalten und die Entwicklung der Mäuse beeinflussen. Diese Faktoren könnten die Variabilität der Trainingsergebnisse erklären und sollten bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Werden die Trainingserfolge der Nachkommen von einmal trainierten Müttern mit den Trainingserfolgen von zweimal trainierten Müttern verglichen, zeigt sich, dass eine wiederholte Trainingseinheit bei den Müttern keine Verbesserung der Trainingserfolge bewirkt. Die Hypothese, dass die trainierten Nachkommen von zweifach trainierten Müttern (Protokoll B: M+N+) im Vergleich zu den Nachkommen von Müttern, die nur einmal trainiert wurden (Protokoll A: M+N+) signifikant mehr Trainingserfolge zeigen, kann widerlegt werden.

Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche Trainingseinheiten bei den Müttern des Crl:CD1(ICR) Stammes keinen signifikanten Einfluss auf die Effektivität des Trainings haben und somit die wiederholte Durchführung des Trainings keinen Mehrwert bietet.

Die Interaktionszeit mit dem Experimentator vor dem Klickertraining beider Geschlechter zeigt keine signifikanten Unterschiede. Unter Berücksichtigung des Geschlechtes konnte gezeigt werden, dass die männlichen Nachkommen, deren Mütter zwei Mal trainiert wurden, signifikant länger mit dem Experimentator interagieren im Vergleich zu den Nachkommen deren Mütter nicht trainiert wurden. Wie bereits zuvor nachgewiesen, zeigten die männlichen Nachkommen von einmal trainierten Müttern bereits eine Tendenz zu einer längeren Interaktionszeit mit dem Experimentator vor dem Training. Nach einer Trainingswiederholung der Mütter (Protokoll B) kann dies nun statistisch bestätigt werden. Das Klickertraining der Mütter verbessert die Interaktionszeit der männlichen Nachkommen vor ihrem eigentlichen Klickertraining. Bei den weiblichen Nachkommen konnte kein Unterschied in der Interaktionszeit nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob die Mütter trainiert wurden oder nicht. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass ein zweifaches Training der Mütter nur bei den männlichen Nachkommen zu einer signifikanten Verlängerung der Interaktionszeit führt. Eine Wiederholung des Trainings der Mütter nach der Geburt bewirkt somit eine Verlängerung der Interaktionszeit mit dem Experimentator bereits vor dem eigentlichen Training der männlichen Nachkommen. Aufgrund der verlängerten Interaktionszeit wird davon ausgegangen, dass die Nachkommen mehr exploratives Verhalten zeigen. Ein längeres exploratives Verhalten lässt Rückschlüsse auf deren Wohlbefinden zu (Fu et al., 2023). Das zweifache Klickertraining der Mütter führt bei ihren männlichen Nachkommen zu einer Verbesserung der Interaktionszeit und somit zu einer Steigerung des Wohlbefindens, da das Angst-assoziierte Verhalten der Nachkommen reduziert ist. Wenn die Nachkommen Angst-assoziierte Verhaltensweisen zeigen würden, würden sie in einer Ecke sitzen und sich nicht bewegen. Sie verfallen in das „freezing“ Verhalten bei dem sie regungslos sitzen bleiben. Die Nachkommen in unseren Versuchen interagieren jedoch mit dem Experimentator d. h. sie riechen, legen eine Pfote auf die Hand oder klettern sogar auf die Hand. Das sind alles freiwillige Verhaltensweisen, die gegen ein Angst-assoziiertes Verhalten sprechen (Hurst and West, 2010, Gouveia and Hurst, 2013, Gouveia and Hurst, 2019). Wie zu erwarten war, verlängert sich die Interaktionszeit mit dem Experimentator nach dem Training. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) beider Geschlechter eine signifikant längere Interaktionszeit im Vergleich zu den trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+), untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) und von untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) zeigen, kann bestätigt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Nachkommen wie auch das der Mütter zu einer Verlängerung der Interaktionszeit mit dem Experimentator führt. Werden die

Interaktionszeiten der trainierten Nachkommen von trainierten Müttern aus Protokoll B (Abbildung 57 A: 17,6 Sekunden) mit denen aus Protokoll A (Abbildung 44 A: 9,8 Sekunden) verglichen, stellte man fest, dass sich die Interaktionszeit verlängert. Ein zweifaches Training der Mütter sowie das Training ihrer Nachkommen (Protokoll B) führen zu einer längeren Interaktionsdauer mit dem Experimentator im Vergleich zu einem einmaligen Klickertraining (Protokoll A). Diese Ergebnisse lassen sich auch auf die männlichen Nachkommen übertragen. Trainierte, männliche Nachkommen von trainierten Müttern (Abbildung 57 B: 19,9 Sekunden) interagieren signifikant länger im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (Abbildung 57 B: 3,2 Sekunden). Die weiblichen Nachkommen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Interaktionszeit, die durch das Training der Nachkommen oder das Training der Mütter beeinflusst werden. Allerdings gibt es eine Signifikanz in der Interaktion. Das bedeutet, dass der Einfluss des Trainings auf die Interaktionszeit davon abhängt, ob das Training bei den Müttern oder den Nachkommen stattfindet. Ein Effekt auf die Interaktionszeit tritt nur dann auf, wenn sowohl die Mütter als auch die Nachkommen trainiert werden. Ein Training, das nur bei den Müttern oder nur bei den Nachkommen durchgeführt wurde, führt zu keinen signifikanten Unterschieden in der Interaktionszeit.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Protokoll B die Interaktionszeit nach dem Klickertraining verlängert im Vergleich zu Protokoll A. In Abhängigkeit der Interaktionszeit ist es ratsam die Mütter zweimal zu trainieren und deren Nachkommen einmal. Dies steigert die Interaktionszeit mit dem Experimentator um bis zu 30 % [(Abbildung 57 A: 17,6 Sekunden \pm 29,33 % von der Gesamtdauer der Interaktion von 60 Sekunden),(Abbildung 44 A: 9,8 Sekunden \pm 16,33 % von der Gesamtdauer der Interaktion von 60 Sekunden) Die Differenz von Protokoll B zu A beträgt 13 %]. Aufgrund der Interaktionszeit kann davon ausgegangen werden, dass das Klickertraining das Wohlbefinden der Mäuse verbessert.

Ob das Wohlbefinden in Bezug auf das Angst-assoziierte Verhalten auch Verbesserungen zeigt, soll die Auswertung des EPMS und OFs liefern. Die Nachkommen beider Geschlechter zeigen keinen Effekt des Klickertrainings weder auf die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen, noch in den geschlossenen Armen oder im Zentrum vom EPM. Lediglich das Training der Mütter verkürzt signifikant die Gesamtlaufstrecke im EPM. Die Hypothese kann bestätigt werden, dass sowohl das gezielte Klickertraining der Mütter ohne die Nachkommen zu trainieren (M+N-) sowie das gezielte Training der Nachkommen ohne die Mütter zu trainieren (M-N+) im Vergleich zu dem gezielten Training der Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) die gleiche Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPMS) zeigen. Die Hypothese, die besagt, dass das gezielte Klickertraining der Mütter ohne die Nachkommen zu trainieren (M+N-) im Vergleich zu

untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) als auch zu den trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) eine signifikant längere Gesamtlaufstrecke und Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des erhöhten Pluslabyrinths (EPMs) aufweist, konnte nicht bestätigt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass ein doppeltes Klickertraining der Mütter keinen Einfluss auf das Angst-assoziierte Verhalten der Nachkommen im EPM zeigt, wobei sowohl männliche als auch weibliche Nachkommen berücksichtigt wurden. Der Effekt des Klickertrainings ist nicht so ausschlaggebend, dass er auf die nächste Generation übertragen werden kann. Auch das alleinige Klickertraining der Nachkommen hat keinen Einfluss auf das Angst-assoziierte Verhalten. Unter Berücksichtigung der weiblichen Nachkommen können keine Auswirkungen des Klickertrainings auf die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMs nachgewiesen werden. Bei den männlichen Nachkommen hingegen verkürzt das Klickertraining der Nachkommen signifikant die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMs. Das Klickertraining der Mütter hat keine Auswirkungen auf die Aufenthaltsdauer der männlichen Nachkommen in den offenen Armen des EPMs.

Die Ergebnisse vom OF Test zeigen keinen signifikanten Effekt auf die Aufenthaltsdauer im Zentrum weder durch das Klickertraining der Mütter noch das der Nachkommen. Es wurde jedoch ein signifikanter Effekt in der Interaktion von dem Klickertraining der Nachkommen und der Mütter nachgewiesen. Sobald beide trainiert werden, sinkt die Aufenthaltsdauer der Nachkommen im Zentrum des OFs. Das doppelte Klickertraining der Mütter verbessert die Aufenthaltsdauer nicht. Im Gegenteil, das doppelte Klickertraining hat eine Verschlechterung zur Folge. Ein möglicher Grund dafür könnten die zu langen Trainingseinheiten sein. Zu viel Training kann negative Folgen haben. Negativ bedeutet, dass es zu Verhaltensveränderungen, erhöhten Corticosteronwerten (Nowacka-Chmielewska et al., 2022), Muskelschäden, verminderter Leistungsfähigkeit und einer Veränderung des Immunsystems kommen kann. Eine Studie konnte nachweisen, dass Mäuse die ein 4 Wochen langes, sich oft wiederholendes Laufbandtraining absolvierten, eine kürzere Laufstrecke im OF sowie eine kürzer Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMs aufzeigten (Chung et al., 2021). Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein zu intensives Laufbandtraining zu einer Verschlechterung des Angst-assoziierten Verhaltens führt. Wir vermuten daher, dass ein doppeltes Klickertraining der Mütter und das Training der Nachkommen, die sich auf insgesamt 3 Wochen Training belaufen, zu viel ist und es aufgrund dessen zu einer Reduktion der Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs kommt. Die Hypothese, dass die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine signifikant längere Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs haben im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) kann widerlegt werden. Auch die Auswertung

der Aufenthaltsdauer in der Peripherie und der Gesamtlaufstrecke im OF zeigen keine statistischen Unterschiede. Die Hypothese, dass die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine signifikant längere Aufenthaltsdauer in der Peripherie und der Gesamtlaufstrecke im OF haben im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) kann widerlegt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) und trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) eine gleich lange Aufenthaltsdauer in der Peripherie und der Gesamtlaufstrecke im OF haben im Vergleich zu den trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+), kann bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das doppelte Klickertraining der Mütter sowie das Training der Nachkommen keine Reduktion des Angst-assoziierten Verhaltens bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm in Bezug auf den OF Test bewirkt. Im Gegenteil, das zweifache Klickertraining der Mütter verschlechtert das Angst-assoziierte Verhalten der Nachkommen. Daher ist eine Wiederholung des Trainings der Mütter bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm nicht nötig.

Die Ergebnisse des Nestbauverhaltens zeigen statistisch keine Unterschiede durch das Klickertraining weder unter Berücksichtigung beider Geschlechter noch bei den männlichen oder den weiblichen Nachkommen. Es wurde angenommen, dass die Nachkommen von Müttern in verschiedenen Trainingszuständen (M+N+, M+N-, M-N+, M-N-) unterschiedliche Werte des Nestbau Scores aufweisen würden. Jedoch wurde diese Hypothese widerlegt. Wir vermuteten, dass ein doppeltes Klickertraining einen größeren Effekt auf das Nestbauverhalten hat. Doch wie durch die Ergebnisse vom EPM und OF nachgewiesen wurde, zeigten die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) den kleinsten Nestbau Score. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass ein doppeltes Klickertraining der Mütter bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm das Wohlbefinden nicht verbessert. Ein hoher Nestbau Score wird gleichgesetzt mit einem guten Wohlbefinden der Tiere. Fühlen sich die Tiere unwohl bauen sie qualitativ schlechter Nester (Jirkof et al., 2013). Allerdings gibt es keine Anzeichen darauf, dass ein doppeltes Training die Qualität der Nester verschlechtert. Unter normalen Umständen (ohne Stressreize für die Mäuse) beträgt der Wert des Nestbau Scores ungefähr 2,5 (Jirkof et al., 2013, Xiong et al., 2018, Neely et al., 2019). In unseren Daten liegt der geringste Nestbau Score bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm bei 2,8. Somit wurde die Aussage getätigt, dass das Klickertraining das Nestbauverhalten der Tiere nicht negativ beeinflusst. Hätten die Mäuse durch das Klickertraining Stress, würde das die kognitive Leistungsfähigkeit reduzieren und zu einem verminderten Nestbauverhalten führen (Gellner et al., 2022). Dies ist aber nicht der Fall.

Die Auswertung des Depressions-assozierten Verhaltens der Mäuse zeigt bei beiden Geschlechtern keine Unterschiede in der Saccharose Präferenz und in der Immobilitätsdauer. Es wurden eine größere Saccharoseaufnahme und eine kürzere Immobilitätsdauer im FST bei trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) vermutet im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-), trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-). Doch diese Hypothese konnte widerlegt werden. Die Hypothese, dass das gezielte Klickertraining der Mütter ohne ihre Nachkommen zu trainieren (M+N-) sowie trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) die gleiche Aufnahme an Saccharoselösung zeigt, kann bestätigt werden. Unter Berücksichtigung des männlichen Geschlechtes konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Saccharose Präferenz und in der Immobilitätsdauer nachgewiesen werden. Die weiblichen Nachkommen haben allerdings durch ihr eigenes Klickertraining eine signifikant reduzierte Saccharoseaufnahme. Das doppelte Klickertraining der Mütter des CD1 Stammes reduzierte die Saccharoseaufnahme nicht, wohingegen das Klickertraining der Nachkommen diese reduziert. Die Saccharose Aufnahme bei trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern liegt bei 51,8 % (Abbildung 63 C). Diese Werte sind laut der Literatur erste Anzeichen für ein anhedonisches Verhalten (Liu et al., 2018). Dennoch behaupten wir, dass das Klickertraining der weiblichen Nachkommen kein anhedonisches Verhalten auslöst. Der Grund, wieso die weiblichen Nachkommen weniger Saccharose konsumieren, kann nicht eindeutig geklärt werden. Die vorherigen Verhaltenstests können Auslöser für eine reduzierte Saccharoseaufnahme sein. Außerdem können Schwankungen in der Umgebung wie Geräusche oder auch der weibliche Zyklus der Mäuse eine Rolle spielen. Der Aufbau der Apparatur weist ebenfalls Schwächen auf. Ein Zwischenfall während der Messung, welcher wohlmöglich unbeobachtet blieb, könnte ein Auslöser dafür sein. Wie im ersten und zweiten Versuchsteil bereits beschrieben, haben wir dennoch die Vermutung, dass das Klickertraining die Saccharoseaufnahme reduziert als unwahrscheinlich. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das doppelte Klickertraining der Mütter keinen Einfluss auf den Saccharosekonsum hat. Lediglich das Klickertraining der weiblichen Nachkommen reduziert die Aufnahme.

Die Ergebnisse des FST, der ebenfalls das Depressions-assozierte Verhalten der Mäuse bewertet, zeigten keine signifikanten Unterschiede, weder im Training der Mütter noch im Training der Nachkommen und das sowohl bei beiden Geschlechtern als auch bei männlichen und weiblichen Nachkommen. Im Gegenteil, die Immobilitätsdauer ist sogar viel kürzer als die Literatur angibt. Wie bereits erwähnt, weist die Literatur eine Immobilitätsdauer von unbehandelten Mäusen im Bereich von 40 bis 50 % (Leidinger et al., 2017, Du Preez et al.,

2020) auf. Dennoch zeigten die weiblichen, untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-), die weiblichen trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und die weiblichen, trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine tendenziell kürzere Immobilitätsdauer im Vergleich zu den weiblichen, untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-). Die maximale Immobilitätsdauer aller weiblichen Gruppen liegt bei 5,7 % (Abbildung 63 C). Das Klickertraining verkürzt die Immobilitätsdauer und fördert somit die aktive Bewältigungsstrategie, was auf ein verbessertes Wohlbefinden schließen lässt (Acklin and Gault, 2015). Die Ergebnisse sind auch auf beide Geschlechter und die männlichen Nachkommen übertragbar. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Immobilitätsdauer zwischen trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+), trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+), von untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) und von untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-). Die Hypothese, dass die Immobilitätsdauer im Schwimmtest von untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) und von trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) signifikant kürzer ist, wurde nicht bestätigt. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) und trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine gleich lange Immobilitätsdauer im Schwimmtest zeigen, kann bestätigt werden. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) eine signifikant kürzere Immobilitätsdauer im Schwimmtest zeigen, kann nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass egal ob die Mütter oder die Nachkommen trainiert werden die Immobilitätsdauer verkürzt wird. Die kürzeste Immobilitätsdauer und somit die aktive Bewältigungsstrategie wird am meisten gefördert durch das doppelte Training der Mütter ohne die Nachkommen zusätzlich noch einmal zu trainieren. Das bedeute, dass die Auswirkungen des Klickertrainings der Mütter auf deren Nachkommen übertragbar sind. In Zukunft könnten die Mütter bei einer CrI:CD1(ICR) Zucht zweifach trainiert werden wodurch sich der positive Effekt des Klickertrainings auf deren Nachkommen übertragen ließe. Dies hätte den Vorteil, dass die Nachkommen unmittelbar nach dem Entwöhnen für die weiteren Versuche bereit wären, ohne dass ein zusätzliches Training erforderlich ist. Dies wäre besonders vorteilhaft für Mäuse, die weniger als eine Woche in der Haltung bleiben, da sie ein einwöchiges Trainingsprogramm zeitlich nicht durchlaufen können. Das doppelte Klickertraining hat keinen Einfluss auf die Corticosteronwerte beider Geschlechter. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Corticosteronkonzentration zwischen trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+), trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+), untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) und untrainierten

Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-). Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) sowie untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) und untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) signifikant eine geringere Corticosteronkonzentration aufweisen, kann nicht bestätigt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) und trainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) die gleiche Corticosteronkonzentration aufweisen wie trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) kann bestätigt werden. Das gleiche betrifft auch die weiblichen Nachkommen. Hier hat das doppelte Klickertraining keine Auswirkungen auf die Corticosteronkonzentration. Lediglich eine Tendenz ist zu erkennen, dass das doppelte Klickertraining der Mütter zusammen mit dem zusätzlichen Training der Nachkommen die Corticosteronkonzentration erhöht. Wohingegen nur das doppelte Training der Mütter ohne die Nachkommen zu trainieren die geringste Konzentration zur Folge hat. Um diese vorläufigen Ergebnisse zu prüfen, muss die Tieranzahl erhöht werden, da aufgrund der Versuchsbedingungen einige Mäuse aus der Auswertung herausgenommen werden mussten. Das Klickertraining der männlichen Nachkommen hingegen führt zu einer signifikanten Zunahme der Corticosteronkonzentration nach dem FST. Diese Ergebnisse sind gegenteilig zu den Ergebnissen aus dem zweiten Versuchsteil. Das Training der männlichen Nachkommen führt zu einer Reduktion der Corticosteronkonzentration. Hier müssen die Ergebnisse aus der Literatur jedoch berücksichtigt werden. Wie zuvor bereits erwähnt, wird eine erhöhte Corticosteronkonzentration nach einer Stressindikation als Indikator für eine Verschlechterung des Wohlbefindens gewertet (Tsuchimine et al., 2020). Eine Erhöhung der Corticosteronkonzentration kann jedoch auch durch Erregung infolge einer erwarteten Belohnung hervorgerufen werden (Ralph and Tilbrook, 2016, Ratuski et al., 2024). Folglich könnte das Klickertraining gefolgt von der Belohnung zu einer Erhöhung der Corticosteronkonzentration führen. Dies könnte als ein Hinweis auf eine Verbesserung des Wohlbefindens interpretiert werden, anstatt auf eine Verschlechterung. Ein Vergleich der Werte aus dieser Studie mit Werten aus der Literatur zeigt, dass das Klickertraining zwar zu einer Erhöhung der Corticosteronkonzentration führt, diese jedoch deutlich unter den Konzentrationen liegt, die nach einem Fixierungs- oder Injektionsstress beobachtet werden (Marchette et al., 2018, Du Preez et al., 2020). Des Weiteren könnte das doppelte Klickertraining der Mütter an der Erhöhung der Corticosteronkonzentration bei den Nachkommen beteiligt sein. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass es bei den männlichen Nachkommen zu einer Erhöhung der Corticosteronkonzentration kam, dies aber kein Anzeichen für eine Verschlechterung des Wohlbefindens war. Das doppelte Klickertraining der Mütter hat keine negativen Auswirkungen auf das Wohlbefinden ihre Nachkommen.

Die Fragestellung die zu Beginn des Versuches untersucht wurde, ob eine Trainingswiederholung der Mütter nach Geburt der Nachkommen eine Verringerung des Angst- und Depressions-assoziierte Verhalten zur Folge hat, kann nicht bestätigt werden. Eine Trainingswiederholung der Mütter zeigt keine Verringerung des Angst- und Depressions-assoziierte Verhalten der Nachkommen. Das doppelte Klickertraining der Mütter zeigt weder positive noch negative Auswirkungen auf das Wohlbefinden der Nachkommen. Obwohl das Klickertraining der Mütter das Wohlbefinden der Nachkommen nicht verbessert, verschlechtert es sich dadurch auch nicht. Insgesamt hat das doppelte Klickertraining einen neutralen Einfluss auf das Wohlbefinden sowie auf Angst- und Depressions-assoziierte Verhalten und wird somit nicht auf die Nachkommen übertragen. Interessanterweise steigt jedoch die Interaktion mit dem Experimentator an, was Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Tiere zulässt. Die Mäuse zeigen ein reduziertes Angstverhalten und vermehrtes Explorationsverhalten, da sie freiwillig die Interaktion mit dem Experimentator suchen. Diese Verhaltensweisen konnten jedoch in spezifischen Angst-assoziierten Verhaltenstests (EPM, OF) sowie in Tests zur Untersuchung des Wohlbefindens (NBT) nicht eindeutig nachgewiesen werden. Wir gehen davon aus, dass die Mäuse das Klickertraining positiv bewerten und deshalb aktiv den Kontakt zum Experimentator suchen in der Erwartung einer Futterbelohnung. Bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm kann auf ein zweifaches Klickertraining der Mütter verzichtet werden.

5.4 VIERTER VERSUCHSTEIL: 10 MINUTEN KLICKEREINFÜHRUNG MIT EINMALIGEM KLICKERTRAINING DER MÜTTER (PROTOKOLL A) DES INZUCHTSTAMM C57BL/6JRJ.

Die Auswirkungen des Klickertrainings auf den Crl:CD1(ICR) Stamm waren gering. Es liegt die Vermutung nahe, dass aufgrund des eher ruhigeren Verhaltens der Mäuse des Crl:CD1(ICR) Stammes die Effekte bei einem aktiveren und nervöseren Mausstamm stärker ausgeprägt sein könnten. Im folgenden Versuchsteil soll daher untersucht werden wie sich das Klickertraining auf den C57BL/6JRj-Stamm auswirkt. Dafür wurde das Klickertrainingsprotokoll A (einmaliges Training der Mütter) mit einer Einführungszeit von 10 Minuten genutzt. Es wurden das Angst- und Depressions-assoziierte Verhalten sowie das Wohlbefinden der Nachkommen untersucht. Aufgrund der zu geringen Tierzahl sowie der unvorhergesehenen Geschlechterverteilung nach Geburt war es nicht möglich eine getrennte Aufteilung in männliche und weibliche Nachkommen vorzunehmen. Die Untersuchung einer weiteren Gruppe, um die Tierzahl zu vergrößern, würde eine geschlechterspezifische Auswertung möglich machen. Daher beziehen sich folgende Ergebnisse auf beide Geschlechter gemeinsam.

Als Erstes wurde die Gewichtszunahme während des Klickertrainings bestimmt. Alle Mäuse nehmen während des Trainings an Gewicht zu. Eine Unterschreitung des Ausgangsgewichts konnte nicht nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen im Vergleich zu untrainierten Nachkommen keine signifikante Reduktion des Körpergewichtes zeigen, konnte bestätigt werden. Ist das Wohlbefinden eingeschränkt oder minimiert, zeigt sich dies anhand einer Reduktion des Körpergewichtes. Eine Verschlechterung des Wohlbefindens führt zu einer Abnahme des Körpergewichtes wohingegen eine Verbesserung des Wohlbefindens zu einer Zunahme des Körpergewichtes führt (Do et al., 2020, Li et al., 2022). Kurz nach einer Narkose können geschlechtsspezifische Unterschiede in der Gewichtsreduktion auftreten (Hohlbaum et al., 2017). Eine andere Studie zeigte, dass das Körpergewicht mit dem Tumorwachstum korreliert. Je größer der Tumor desto größer ist die Gewichtsabnahme (JACOBSEN et al., 2013). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird das Körpergewicht als Indikator genutzt, um Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Tiere machen zu können. Das Klickertraining hat keine Reduktion des Gewichtes zur Folge und somit ist das Wohlbefinden in Bezug auf das Körpergewicht nicht negativ beeinflusst. Lediglich das Klickertraining der Nachkommen bewirkt eine geringere Gewichtszunahme im Vergleich zu dem Training der Mütter. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining weder bei den Nachkommen noch bei den Müttern zu einer Verschlechterung des Wohlbefindens in Bezug auf das Körpergewicht führt.

Die Auswertung der Trainingserfolge beider Geschlechter des C57BL/6JRj Stammes bei einer Einführungszeit von 10 Minuten zeigt einen signifikanten Anstieg mit den Trainingstagen. Das betrifft sowohl die Trainingserfolge von trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) als auch die Erfolge von trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+). Das Klickertraining der Mütter hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Trainingserfolge. Erst ab Tag 4 gibt es einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit des Trainingsverhaltens zwischen den Nachkommen von trainierten und untrainierten Müttern. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) signifikant mehr Trainingserfolge zeigen im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) kann bestätigt werden. Insgesamt wurde festgestellt, dass die Nachkommen mit zunehmenden Trainingseinheiten ihre Erfolge im Training steigern. Aufgrund dieser Ergebnisse können wir davon ausgehen, dass die Mäuse das Klickertraining verstanden haben und auf den Klick konditioniert wurden. Ein zusätzliches Klickertraining der Mütter ist bei dem C57BL/6JRj Stamm ratsam in Bezug auf die Trainingserfolge. Aber auch ohne ein Training der Mütter lassen sich die Nachkommen auf den Klick konditionieren und verbessern ihr Trainingsverhalten. Werden nun die Trainingserfolge des C57BL/6JRj Stammes mit den Trainingserfolgen des Crl:CD1(ICR) Stammes verglichen, wird deutlich, dass der C57BL/6JRj Stamm deutlich mehr Trainingserfolge zeigt und sich somit besser trainieren lässt. Die

Hypothese, wonach trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) des C57BL/6JRj Stammes im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) des Crl:CD1(ICR) Stammes die gleiche Anzahl an Trainingserfolgen aufweisen, kann widerlegt werden. Signifikanzen lassen sich im Faktor Trainingstage und Stamm sowie in der Interaktion nachweisen. Die Nachkommen des C57BL/6JRj Stammes zeigen bereits ab dem zweiten Trainingstag signifikant mehr Trainingserfolge als der Crl:CD1(ICR) Stamm. Vorläufige Ergebnisse zeigen eine Tendenz, dass die männlichen Nachkommen mehr von einem Training profitieren als die weiblichen Nachkommen. Um eine statistische Aussage darüber treffen zu können, muss die Tierzahl vergrößert werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining sowohl bei dem C57BL/6JRj Stamm als auch bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm anwendbar ist.

Die Auswertung der Interaktionszeit zeigt keine signifikanten Unterschiede weder vor noch nach dem Training. Wir erwarteten, dass aufgrund der hohen Trainingserfolge die Interaktionszeit mit dem Experimentator nach dem Training zunimmt. Die Interaktionszeit nach dem Training liegt im Bereich zwischen 3,3 und 5,6 Sekunden (Abbildung 63 B). Somit ist diese statistisch nicht länger im Vergleich zu vor dem Training, welche bei 4,1 und 4,2 Sekunden (Abbildung 69 A) liegt. Die Hypothese, dass das gezielte Klickertraining der Mütter ohne die Nachkommen zu trainieren (M+N-) im Vergleich zu trainierte (M-N+) und untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) eine signifikant längere Interaktionszeit mit dem Experimentator zeigt, kann widerlegt werden. Die Hypothese, dass das gezielte Klickertraining der Mütter ohne die Nachkommen zu trainieren (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) die gleiche Interaktionszeit mit dem Experimentator zeigt, kann bestätigt werden. Ein Training der Nachkommen und ein Training der Mütter verbessern die Interaktionszeit mit dem Experimentator. Wohingegen das einzelne Training nur der Mütter oder nur der Nachkommen die Interaktionszeit kürzer ist im Vergleich zu den untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass ein Training der Nachkommen und der Mütter des C57BL/6JRj Stammes die Interaktion tendenziell verbessert. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl ein Training der Muttertiere als auch der Nachkommen zu einer verkürzten Interaktionszeit mit dem Experimentator führt, verglichen mit den Mäusen, die kein Training erhielten. Weitere Wiederholungen des Versuchs, um die Tierzahl zu vergrößern, sind nötig, um statistisch zu prüfen, ob die Tendenz signifikant wird. Im Vergleich zu dem Crl:CD1(ICR) Stamm zeigt der C57BL/6JRj Stamm dennoch deutlich weniger Interaktion mit dem Experimentator. Eine Möglichkeit die Interaktion mit dem Experimentator zu verbessern, wäre das Trainingsprotokoll von einer auf zwei Wochen zu verlängern. Eine andere Möglichkeit wäre, zu untersuchen, ob ein doppeltes Training der Mütter die Interaktionszeit der

Nachkommen mit dem Experimentator verbessert. Der C57BL/6JRj Stamm ist generell ein eher aktiver Mausstamm (Labs, 28.06.2024), weshalb es gut möglich ist, dass die Mäuse mehr Zeit benötigen, um länger mit dem Experimentator zu interagieren - unabhängig von dem Trainingserfolg. Die Mäuse, die gut im Training sind, müssen dadurch nicht zwangsläufig länger interagieren. Durch das Klickertraining und der Handhabe mittels Tunnel, ist der direkte Kontakt mit dem Experimentator nicht gegeben. Die Ursache, wieso die C57BL/6JRj Mäuse nach dem Training nicht länger interagieren, kann nicht eindeutig geklärt werden. Ob eine Reduktion des Angst-assoziierten Verhaltens durch das Training bewirkt wurde, kann erst mit den folgenden Angst-assoziierten Verhaltenstests untersucht werden. Anhand der Auswertung der Interaktionszeit kann keine Reduktion des Angst-assoziierten Verhaltens beobachtet werden, weder durch das Training der Nachkommen noch durch das Training der Mütter. Auch eine Übertragung des Effektes vom Klickertraining auf die Nachkommen kann nicht bestätigt werden. Bereits hier zeigen sich Unterschiede in der Auswirkung des Klickertrainings zwischen dem C57BL/6JRj und dem Crl:CD1(ICR) Stamm.

Unter Berücksichtigung des Angst-assoziierten Verhaltens wurden Verhaltenstest wie der EPM und OF Test ausgewertet. Die Aufenthaltsdauer in den offenen sowie geschlossenen Armen und im Zentrum des EPMS zeigt keine signifikanten Unterschiede unabhängig davon, ob die Nachkommen oder die Mütter zuvor trainiert wurden. Lediglich in der Gesamtlaufstrecke (Abbildung 70 D) wurde ein signifikanter Effekt in der Interaktion (2-way ANOVA) des Klickertrainings der Mütter sowie deren Nachkommen nachgewiesen. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) eine längere Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMS zeigen, kann widerlegt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine gleiche lange Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPMS zeigen, kann bestätigt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) eine längere Gesamtlaufstrecke im EPM zurücklegen, wurde widerlegt. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine längere Gesamtlaufstrecke im EPM zurücklegen, wurde widerlegt.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass sowohl das Klickertraining der Nachkommen als auch das Training der Mütter zu keiner signifikanten Reduzierung des Angst-assoziierten Verhaltens führen. Auch eine Übertragung des Effektes vom Klickertraining auf die Nachkommen findet zum jetzigen Zeitpunkt nicht statt. Es wurde kein Unterschied in der

Aufenthaltsdauer in den offenen Armen nachgewiesen. Werden diese Daten mit der Literatur (Dickmann et al., 2022, Melgar-Locatelli et al., 2024) verglichen, wird deutlich, dass die Aufenthaltsdauer stark variieren kann. Die Aufenthaltsdauer bei C57BL6/JRj Mäusen beträgt ca. 45 Sekunden (Dickmann et al., 2022, Melgar-Locatelli et al., 2024). Im Gegensatz dazu wurde eine Aufenthaltsdauer von mindestens 88,7 Sekunden (Abbildung 70 A) in den offenen Armen des EPMs festgestellt. Im Vergleich zu der Literatur führt das Klickertraining zu einer Reduktion des Angst-assoziierten Verhaltens. Dennoch sollten die untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern nicht ignoriert werden. Diese Ergebnisse waren unerwartet, jedoch ist zu beachten, dass alle Mäuse keinem Stressreiz ausgesetzt waren und dass alle Mäuse mit der Hand umgesetzt wurden. Dies führt auch bei den untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern zu keinen Veränderungen.

Das Klickertraining hat Auswirkungen auf die Gesamtlaufstrecke im EPM. Ein Training der Mütter wie auch ihrer Nachkommen bewirkt eine längere Laufstrecke. Eine längere Laufstrecke deutet auf ein gesteigertes exploratives Verhalten der Mäuse hin. Dieses vermehrte Erkunden unterstützt die Ausübung natürlicher Verhaltensweisen, was wiederum zu einer Verbesserung des Wohlbefindens der Mäuse beiträgt (Fu et al., 2023). Das Klickertraining verbessert das Wohlbefinden in Bezug auf die Gesamtlaufstrecke im EPM. Die Auswirkungen des Klickertraining sind vermutlich zu gering um Unterschiede zu erkennen. Es wurde davon ausgegangen, dass die Mäuse weder gestresst sind noch Angst-assoziierte Verhaltensweisen zeigen. Bei Mäusen die kein Angst-assoziiertes Verhalten zeigen, kann dieses Verhalten auch nicht reduziert werden.

Die Ergebnisse des OFs zeigen keine Unterschiede in der Aufenthaltsdauer im Zentrum und in der Peripherie zwischen dem Klickertraining der Nachkommen und der Mütter. Es wurde vermutet, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierte Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) eine längere Aufenthaltsdauer im Zentrum zeigen sollten. Doch diese Hypothese kann widerlegt werden. Die Hypothese, dass untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine gleich lange Aufenthaltsdauer im Zentrum aufweisen, kann bestätigt werden. Die trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) zeigen tendenziell die längste Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs. Wohingegen die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) die kürzeste Aufenthaltsdauer im Zentrum haben. Unerwarteterweise haben aber die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) die längste Laufstrecke. Das Klickertraining der Mütter erhöht signifikant die Laufstrecke im Vergleich zu dem Training der Nachkommen. Anhand dieser Ergebnisse wird vermutet, dass das Klickertraining der Mütter das explorative Verhalten vergrößert und somit das

Wohlbefinden verbessert (Fu et al., 2023). Aber wenn dies so ist, müssten die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern aber auch die längste Aufenthaltsdauer im Zentrum nachweisen. Ein möglicher Grund hierfür ist, die zu geringe Anzahl an Tieren, wie es bereits zuvor schon einmal erwähnt wurde. Es wird angenommen, dass bei weiteren Versuchen das Minimum und Maximum bei den untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) in Bezug auf die Aufenthaltsdauer im Zentrum des OFs nicht mehr so eine große Differenz hat. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining der Mütter des C57BL/6JRj Stammes ausschlaggebend ist, um eine Reduktion des Angst-assoziierten Verhaltens in Bezug auf den die Gesamtlaufstrecke im OF zu bewirken.

Die Auswirkungen des Klickertrainings auf das Nestbauverhalten des C57BL/6JRj Stammes ergab keine Unterschiede im Vergleich zu den untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-). Lediglich eine Tendenz ist nachweisbar, dass das Klickertraining der Nachkommen und das Training der Mütter das Nestbauverhalten positiv beeinflussen und dadurch qualitativ bessere Nester gebaut wurden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) einen signifikant höheren Nestbau Score haben, wurde nicht bestätigt. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) signifikant einen höheren Nestbau Score zeigen, kann nicht bestätigt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) den gleichen Nestbau Score zeigen, kann bestätigt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass eine Übertragung des Effektes vom Klickertraining auf die Nachkommen zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich war. Dennoch gibt es erste Tendenzen, dass das Klickertraining der Mütter wie auch das von ihren Nachkommen den Nestbau Score verbessert. Weitere Versuche können mehr Information liefern auch bezogen auf geschlechterspezifische Unterschiede. Es wird vermutet, dass unter normalen Bedingungen also ohne einen Stressreiz bei den Mäusen keine weitere Verbesserung mehr möglich ist. Eine Verschlechterung kann dadurch aber ausgeschlossen werden.

Die Auswirkung des Klickertrainings auf das Depressions-assoziierte Verhalten des C57BL/6JRj Stammes wurde mittels Saccharose Präferenz und Schwimmtest ermittelt. Die Ergebnisse des Saccharose Präferenztest ergab keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-). Es wurde vermutet, dass die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) signifikant mehr Saccharose konsumieren. Diese Hypothese

konnte widerlegt werden. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) signifikant mehr Saccharose konsumieren, wurde nicht bestätigt. Die Annahme, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) genauso viel Saccharose konsumieren wie trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) kann bestätigt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining keinen Einfluss auf den Saccharosekonsum hat. Eine Übertragung auf die Nachkommen ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Es zeigt sich lediglich eine Tendenz, dass das Klickertraining der Mütter (Abbildung 73: M+N- 93,7 %) zu einem erhöhten Saccharosekonsums führt und somit das Wohlbefinden verbessert, da kein Depressions-assoziiertes Verhalten erkennbar ist (Du Preez et al., 2020, Primo et al., 2023). Diese Daten lassen sich auch auf den Schwimmtest übertragen. Auch hier wurde vermutet, dass die untrainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) signifikant eine kürzere Immobilitätsdauer zeigen. Diese Hypothese konnte widerlegt werden. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) signifikant eine kürzere Immobilitätsdauer zeigen, kann nicht bestätigt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) eine gleich lange Immobilitätsdauer zeigen, kann bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining weder von den Nachkommen noch von den Müttern einen Einfluss auf die Immobilitätsdauer im Schwimmtest hat. Eine Übertragung auf die Nachkommen ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Die Immobilitätsdauer ist bei dem C57BL/6JRj Stamm mit maximal 31,1 % (Abbildung 74: M+N-) länger als bei dem Crl:CD1(ICR) Stamm (Abbildung 38: M+N- 20,6 %). In der Literatur wird berichtet, dass der CD1 Stamm generell eine kürzere Immobilitätsdauer aufweist als der C57BL/6JRj Stamm (Au - Can et al., 2012, Diez-Solinska et al., 2024). Allerdings ist die Immobilitätsdauer des C57BL/6JRj Stammes durch das Klickertraining kürzer als die Literatur beschreibt (Diez-Solinska et al., 2024). Dies lässt die Vermutung zu, dass das Klickertraining der Mütter und der Nachkommen trotzdem einen Effekt auf die Immobilitätsdauer haben kann, was durch weitere Versuche geklärt werden muss.

Wie zuvor bereits mehrmals erwähnt, wird die Corticosteronkonzentration im Blut genutzt, um das Wohlbefinden sowie den Schweregrad der Belastung von Mäusen durch Experimente zu evaluieren (Leenaars et al., 2020). Die Ergebnisse der Corticosteronauswertung zeigen, wie die Verhaltenstests zuvor, keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern. Auch hier wurde vermutet, dass untrainierte

Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) und untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) eine signifikant geringere Corticosteronkonzentration aufweisen. Diese Hypothese wurde nicht bestätigt. Die Hypothese, dass trainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N+) signifikant eine geringere Corticosteronkonzentration haben, kann nicht bestätigt werden. Die Hypothese, dass untrainierte Nachkommen von trainierten Müttern (M+N-) im Vergleich zu trainierten Nachkommen von trainierten Müttern (M+N+) die gleiche Corticosteronkonzentration haben, kann bestätigt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das Klickertraining keinen Einfluss auf die Corticosteronkonzentration hat im Vergleich zu untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-). Eine Übertragung der Effekte auf die Nachkommen kann zum jetzigen Zeitpunkt ausgeschlossen werden. Wie zuvor erwähnt, bleibt die Corticosteronkonzentration auch bei dem C57BL/6JRj Stamm nach dem Schwimmtest immer weiterhin niedrig. Alle Corticosteronkonzentrationen sind wesentlich geringer, wie die Werte aus der Literatur angeben (Marchette et al., 2018). Das Klickertraining kann die Corticosteronkonzentration im Vergleich zu den Daten aus der Literatur (Marchette et al., 2018) reduzieren und trägt somit zu einer Verbesserung des Wohlbefindens bei.

Das Klickertraining kann bei dem C57BL/6JRj Stamm angewendet werden. Entsprechende Anpassungen an die Dauer des Protokolls sollten vorgenommen werden. Eine Reduzierung des Angst- und Depressions-assoziierten Verhaltens kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht bestätigt werden. Dafür sind weitere Versuche notwendig. Um etwas über den geschlechterspezifischen Unterschied herauszufinden sind ebenfalls weitere Versuche notwendig. In den Ergebnissen wurden keine Unterschiede zu den untrainierten Nachkommen von untrainierten Müttern (M-N-) festgestellt. Es wird angenommen, dass unter normalen Bedingungen (ohne Stressindikation) keine weitere Steigerung des Wohlbefindens möglich ist. Dennoch lassen sich Unterschiede zu den in der Literatur beschriebenen Daten feststellen. Unter Berücksichtigung der Literaturdaten zeigt sich, dass das Klickertraining sowohl bei den Müttern als auch bei den Nachkommen zu einer Verbesserung des Wohlbefindens beiträgt, was dem Prinzip der 3R-Forschung entspricht.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Das Klickertraining der Mütter wie auch der Nachkommen hat das Potenzial, das Wohlbefinden der Labortiere zu verbessern nicht nur, da es die Interaktion mit dem Experimentator verbessert, sondern weil es das Angst- und Depressions-assoziierte Verhalten beeinflussen kann. Wichtig ist, dass jeder Stamm und jede Tierart sowie das Geschlecht anders auf das Klickertraining reagieren. Deshalb sollte zu Beginn immer zuerst das Protokoll an die jeweiligen Tiere angepasst werden. Selbst innerhalb einer Spezies können enorme Unterschiede zustande kommen. Es ist wichtig zu beachten, dass es sich hier um Lebewesen handelt, die nicht immer konsistentes Verhalten zeigen. Daher kann es während der Trainingsphase zu Unterschieden kommen. Der CrI:CD1(ICR) Stamm lässt sich auf den Klick konditionieren. Sowohl bei einer Einführungszeit von 10 als auch von 5 Minuten. Wohingegen eine 5-minütige Einführungszeit ausreichend ist, da die Tiere einen deutlichen Lerneffekt zeigen. Die männlichen Nachkommen des CrI:CD1(ICR) Stammes profitieren mehr von einem Klickertraining der Mütter als von ihrem eigenen Training. Wohingegen die weiblichen Nachkommen des CrI:CD1(ICR) Stammes von ihrem eigenen Training profitieren. Von einem zweifachen Klickertraining der Mütter kann abgesehen werden, da dies keinen Mehrwert bringt. Lediglich die Interaktionszeit mit dem Experimentator wird dadurch verbessert. Der positive Effekt des Klickertrainings kann auf die männlichen, aber nicht auf die weiblichen Nachkommen übertragen werden in Bezug auf die Interaktionszeit. Das bedeutet, dass es sich bei den männlichen Nachkommen des CrI:CD1(ICR) Stammes anbietet die Mütter vorher zu trainieren. Dies kann jedoch auch als Nachteil angesehen werden, da viele Forscher ihre Versuchstiere von einem kommerziellen Anbieter beziehen anstatt eine eigene Zucht zu führen. In solchen Fällen wäre ein Klickertraining der Mütter nicht umsetzbar. Zudem müssen die Haltungskosten, die überzähligen Tiere und der Platzbedarf berücksichtigt werden. Dennoch bietet die eigene Zucht auch erhebliche Vorteile. Zum einen entfällt der Transport, was den Stress der Tiere reduziert. Zum anderen fällt die Eingewöhnungsphase weg, da durch frühzeitige Interaktion eine Gewöhnung an den Umgang mit den Experimentatoren bereits erfolgt ist. Diese Aufgaben müssten nicht zwingend vom Experimentator selbst durchgeführt werden, sondern könnten von Tierpflegern übernommen werden, die ohnehin für die Pflege der Tiere zuständig sind. Der Experimentator würde somit trainierte Tiere für seine Experimente erhalten. Ein weiterer entscheidender Vorteil liegt in der Struktur bestimmter Experimente, bei denen die Versuchstiere nicht länger als eine Woche an Experimenten beteiligt sind. In solchen Fällen wäre es zeitlich für den Experimentator kaum möglich ein Klickertraining der Nachkommen durchzuführen. Leider wurden keine Auswirkungen des Klickertrainings auf das Angst- und Depressions-assoziierte Verhalten der Tiere nachgewiesen. Ein möglicher Grund hierfür wäre die stressfreie Haltung und

Handhabung der Tiere. Wie bereits erwähnt wurden die Tiere keinem Stressreiz ausgesetzt. Eine Verbesserung des Wohlbefindens ist daher nicht möglich. Dies zeigt aber auch, dass die Tiere bereits ein hohes Wohlbefinden aufweisen (auch die untrainierten Nachkommen) und es mit den Verhaltenstests vereinbar ist. Lediglich das explorative Verhalten der Tiere nimmt mit dem Klickertraining zu. In Zukunft wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob das Klickertraining dazu beitragen kann einen Stressreiz abzuschwächen oder zu kompensieren.

Der C57BL/6JRj Stamm lässt sich ebenfalls bei einer Einführungszeit von 10 Minuten auf den Klick konditionieren. Die ersten Ergebnisse zeigen eine Tendenz, dass das Klickertraining auf die Nachkommen übertragen werden kann. Um dies statistisch zu belegen, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Eine Reduktion des Angst- und Depressions-assoziierten Verhaltens durch das Klickertraining kann nicht nachgewiesen werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Richtlinie 63/2010/EU verlangt, dass vor jedem Experiment ein Trainingsprogramm durchgeführt werden muss, um das Wohlbefinden der Tiere durch Stressreduktion zu erhöhen. Diese Dissertation untersucht den Einfluss des Klickertrainings, einer Refinementmethode, auf die Mausstämme Crl:CD1(ICR) und C57BL/6JRj. Das Klickertraining, welches bereits seit langem in der Forschung als nützliche Trainingsmethode etabliert ist, wird eingesetzt, um die Interaktion und Handhabung durch den Experimentator zu verbessern und den Stress der Tiere zu reduzieren. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des Klickertrainings auf biochemische und verhaltensbezogene Wohlbefindensmarker bei dem Crl:CD1(ICR) und dem C57BL/6JRj Mausstamm zu bewerten und zu prüfen, ob die Effekte auf ihre Nachkommen übertragbar sind. Zur Analyse wurden die Trainingserfolge, die Interaktionszeit mit dem Experimentator, eine Reihe von Verhaltenstests (EPM, OF, NBT, SPT und FST) sowie das Stresshormon Corticosteron mittels computergestützter Auswertungssysteme analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das Klickertraining keine signifikanten Auswirkungen auf das Angst- und Depressions-assoziierte Verhalten sowie auf das Stresshormon bei dem Crl:CD1(ICR) und dem C57BL/6JRj Mausstamm hat. Dennoch deuten die signifikanten Trainingserfolge darauf hin, dass die Konditionierung durch das Klickertraining erfolgreich war. Für den Crl:CD1(ICR) Stamm kann die Klickereinführungszeit von 10 Minuten auf 5 Minuten reduziert werden. Wiederholtes Training mit den Crl:CD1(ICR) Müttern veränderte das Verhalten nicht, verbesserte jedoch die Interaktionszeit mit dem Experimentator und das Explorationsverhalten. Eine Übertragung des positiven Effektes vom Klickertraining erfolgt nur bei den männlichen Nachkommen des Crl:CD1(ICR) Stammes und nur unter Berücksichtigung der Interaktionszeit. Eine Reduktion des Stresshormonspiegels konnte nicht nachgewiesen werden, wobei die generell niedrigen Plasmakonzentrationen zu berücksichtigen sind. Darüber hinaus wurden stammes- und geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet, was eine Anpassung des Klickertrainingsprotokolls erforderlich macht. Diese Dissertation zeigt, dass das Klickertraining unter stressfreien Bedingungen keine großen Auswirkungen auf das Wohlbefinden der Mäuse hat, da das Wohlbefinden bereits sehr hoch ist. Aufgrund des hohen Wohlbefindens der Tiere weichen die Parameter nicht stark voneinander ab und es sind keine Auswirkungen des Trainings auf die Versuchsergebnisse zu befürchten. Es kann jedoch die freiwillige Interaktion mit dem Experimentator sowie das explorative Verhalten fördern, was laut Literatur auf eine Verringerung von Angst-assoziiertem Verhalten und eine Verbesserung des Wohlbefindens hinweist. Das Klickertraining kann als Refinementmethode bei Mäusen angewendet werden, um die Akklimation zu erleichtern, die Mensch-Tier-Interaktion und die allgemeine Handhabung zu verbessern. Dies leistet einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung des Wohlbefindens von Mäusen und zu einer reproduzierbareren Wissenschaft.

8. ABSTRACT

The Directive 63/2010/EU requires that a training program has to be conducted before any experiment to increase the animal welfare by reducing stress. This dissertation examines the influence of clicker training, a refinement method, on the mouse strains Crl:CD1(ICR) and C57BL/6JRj. The clicker training, which has long been established as a useful training method in research, is used to improve interaction and handling by the experimenter and to reduce stress in animals. The aim of this study was to evaluate the effects of clicker training on biochemical and behavioral markers of well-being in the Crl:CD1(ICR) and C57BL/6JRj mouse strains and whether its effects are transferred to their offsprings.

After the training phase, I measured training success, interaction time with the experimenter, a sequence of behavioral tests (EPM, OF, NBT, SPT, and FST), and the stress hormone corticosterone was analyzed using computer-based programs. The results show that clicker training had no significant effect on anxiety- and depression-associated behaviors or on the stress hormone levels in the Crl:CD1(ICR) and C57BL/6JRj strains. The training was successful in both strains, indicating that conditioning through clicker training was effective. The Crl:CD1(ICR) strain required 5 minutes less of, the clicker introduction. Repeated training with the Crl:CD1(ICR) mothers did not change behavior, but improved the interaction time with the experimenter and exploratory behavior. The positive effect of clicker training is only transferred to the male offspring of the Crl:CD1(ICR) strain and only if the interaction time is taken into account. Corticosterone level did not vary significantly, although the generally low plasma concentrations have to be taken into account. Furthermore, strain- and sex-specific differences were observed, necessitating an adjustment of the clicker training protocol.

This dissertation shows that clicker training under stress-free conditions has minimal impact on the well-being of mice, as their baseline well-being is already very high. Due to this high level of well-being, the measured parameters show little variation and there is no reason to fear any effects of the training on the experimental results. However, it can promote voluntary interaction with the experimenter and exploratory behaviour, which, according to the literature, indicates a reduction in anxiety-associated behaviour and an improvement in well-being. Clicker training can be applied as a refinement method in mice, facilitates acclimatization, improves human-animal interaction and general handling. This makes an important contribution by improving the welfare of mice and more reproducible science.

9. REFERENZEN

- ACKLIN, C. J. & GAULT, R. A. 2015. Effects of natural enrichment materials on stress, memory and exploratory behavior in mice. *Lab Anim (NY)*, 44, 262-7.
- AHLGREN, J. & VOIKAR, V. 2019. Housing mice in the individually ventilated or open cages-Does it matter for behavioral phenotype? *Genes Brain Behav*, 18, e12564.
- AMAZON. *Weißer Schokoladencreme, Brinkers* [Online]. Available: <https://www.amazon.de/Brinkers-Nr-Creme-wei%C3%9Fe-Schokolade/dp/B0943LDPKJ?th=1> [Accessed 22.10.24].
- ANIMALS., N. R. C. U. C. O. P. A. D. I. L. 1992. *Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals.*, National Research Council (US).
- ARCK, P. C. 2001. Stress and Pregnancy Loss: Role of Immune Mediators, Hormones and Neurotransmitters. *American Journal of Reproductive Immunology*, 46, 117-123.
- ASSISTANT, E. D. 2024. *Helping researchers worldwide design robust and reliable experiments* [Online]. EDA. Available: <https://eda.nc3rs.org.uk/> [Accessed 30.07.2024].
- ATAALLAHI, M., NEJAD, J. G. & PARK, K. H. 2022. Selection of appropriate biomatrices for studies of chronic stress in animals: a review. *J Anim Sci Technol*, 64, 621-639.
- ATKINSON, H. C. & WADDELL, B. J. 1997. Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle*. *Endocrinology*, 138, 3842-3848.
- AU - CAN, A., AU - DAO, D. T., AU - ARAD, M., AU - TERRILLION, C. E., AU - PIANTADOSI, S. C. & AU - GOULD, T. D. 2012. The Mouse Forced Swim Test. *JoVE*, e3638.
- AZAR, T. A., SHARP, J. L. & LAWSON, D. M. 2008. Effect of housing rats in dim light or long nights on heart rate. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 47, 25-34.
- BAILOO, J. D., MURPHY, E., BOADA-SAÑA, M., VARHOLICK, J. A., HINTZE, S., BAUSSIÈRE, C., HAHN, K. C., GÖPFERT, C., PALME, R., VOELKL, B. & WÜRBEL, H. 2018. Effects of Cage Enrichment on Behavior, Welfare and Outcome Variability in Female Mice. *Front Behav Neurosci*, 12, 232.
- BARNES, J., BRENDEL, M., GAO, V. R., RAJENDRAN, S., KIM, J., LI, Q., MALMSTEN, J. E., SIERRA, J. T., ZISIMOPOULOS, P., SIGARAS, A., KHOSRAVI, P., MESEGUER, M., ZHAN, Q., ROSENWAKS, Z., ELEMENTO, O., ZANINOVIC, N. & HAJIRASOULIHA, I. 2023. A non-invasive artificial intelligence approach for the prediction of human blastocyst ploidy: a retrospective model development and validation study. *Lancet Digit Health*, 5, e28-e40.
- BECKER, M., PINHASOV, A. & ORNOY, A. 2021. Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? *Diagnostics (Basel)*, 11.

- BENAROYA-MILSHTEIN, N., HOLLANDER, N., APTER, A., KUKULANSKY, T., RAZ, N., WILF, A., YANIV, I. & PICK, C. G. 2004. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *European Journal of Neuroscience*, 20, 1341-1347.
- BOTIA, M., ESCRIBANO, D., MARTINEZ-SUBIELA, S., TVARIJONAVICIUTE, A., TECLES, F., LOPEZ-ARJONA, M. & CERON, J. J. 2023. Different Types of Glucocorticoids to Evaluate Stress and Welfare in Animals and Humans: General Concepts and Examples of Combined Use. *Metabolites*, 13.
- BROWN, W. 1912. Animal Intelligence: Experimental Studies. *Nature*, 88, 306-307.
- BRUNTON, P. J. 2013. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction*, 146, R175-89.
- BRUNTON, P. J. & RUSSELL, J. A. 2010. Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects. *J Neuroendocrinol*, 22, 258-71.
- BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ, B. F. J. 2024. *Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV)* [Online]. Bundesministerium der Justiz, Bundesamt für Justiz. Available: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html> [Accessed 06.08.2024].
- ÇALIŞKAN, H., KARAKAYA, D., KOÇAK, S., ÖMERCIOĞLU, G. & BAŞTUĞ, M. 2024. Effect of high-intensity interval training on self-care and anxiety-like behaviors in naive rats. *Experimental Brain Research*, 242, 913-920.
- CAN, A., BLACKWELL, R. A., PIANTADOSI, S. C., DAO, D. T., O'DONNELL, K. C. & GOULD, T. D. 2011. Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains. *Genes Brain Behav*, 10, 434-43.
- CHALLA, K., PAYSAN, D., LEISER, D., SAUDER, N., WEBER, D. C. & SHIVASHANKAR, G. V. 2023. Imaging and AI based chromatin biomarkers for diagnosis and therapy evaluation from liquid biopsies. *npj Precision Oncology*, 7, 135.
- CHIA, R., ACHILLI, F., FESTING, M. F. W. & FISHER, E. M. C. 2005. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics*, 37, 1181-1186.
- CHUNG, Y., HSIAO, Y. T. & HUANG, W. C. 2021. Physiological and Psychological Effects of Treadmill Overtraining Implementation. *Biology (Basel)*, 10.
- CIMARELLI, G., SCHOESSWENDER, J., VITIELLO, R., HUBER, L. & VIRÁNYI, Z. 2021. Partial rewarding during clicker training does not improve naïve dogs' learning speed and induces a pessimistic-like affective state. *Anim Cogn*, 24, 107-119.

- CLANCY, B. M., THERIAULT, B. R., TURCIOS, R., LANGAN, G. P. & LUCHINS, K. R. 2023. The Effect of Noise, Vibration, and Light Disturbances from Daily Health Checks on Breeding Performance, Nest Building, and Corticosterone in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 62, 291-302.
- CLARKSON, J. M., DWYER, D. M., FLECKNELL, P. A., LEACH, M. C. & ROWE, C. 2018. Handling method alters the hedonic value of reward in laboratory mice. *Sci Rep*, 8, 2448.
- COMMONS, K. G., CHOLANIANS, A. B., BABB, J. A. & EHLINGER, D. G. 2017. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci*, 8, 955-960.
- CZUBALA, M. A., EILLES, E., STAUBI, A., IPSEIZ, N., VOGT, M., ZIEGLOWSKI, L., ERNST, L., TOLBA, R. H., TAYLOR, P. R. & WEISKIRCHEN, R. 2022. 3R Blackboard: A platform for animal and organ sharing. *Lab Anim*, 56, 292-296.
- DAUCHY, R. T., BLASK, D. E., HOFFMAN, A. E., XIANG, S., HANIFIN, J. P., WARFIELD, B., BRAINARD, G. C., ANBALAGAN, M., DUPEPE, L. M., DOBEK, G. L., BELANCIO, V. P., DAUCHY, E. M. & HILL, S. M. 2019. Influence of Daytime LED Light Exposure on Circadian Regulatory Dynamics of Metabolism and Physiology in Mice. *Comp Med*, 69, 350-373.
- DAUCHY, R. T., HANIFIN, J. P., BRAINARD, G. C. & BLASK, D. E. 2024. Light: An Extrinsic Factor Influencing Animal-based Research. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 63, 116-147.
- DE CATANZARO, D. 1988. Effect of predator exposure upon early pregnancy in mice. *Physiol Behav*, 43, 691-6.
- DEACON, R. M. 2006. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc*, 1, 1117-9.
- DENNINGER, J. K., SMITH, B. M. & KIRBY, E. D. 2018. Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget. *J Vis Exp*.
- DI DALMAZI, G., PAGOTTO, U., PASQUALI, R. & VICENNATI, V. 2012. Glucocorticoids and type 2 diabetes: from physiology to pathology. *J Nutr Metab*, 2012, 525093.
- DICKMANN, J., GONZALEZ-UARQUIN, F., REICHEL, S., PICHL, D., RADYUSHKIN, K., BAUMGART, J. & BAUMGART, N. 2022. Clicker Training Mice for Improved Compliance in the Catwalk Test. *Animals (Basel)*, 12.
- DIEZ-SOLINSKA, A., GONI-BALENTZIAGA, O., BEITIA-OYARZABAL, G., MUNOZ-CULLA, M., VEGAS, O. & AZKONA, G. 2024. Chronic defeat stress induces monoamine level dysregulation in the prefrontal cortex but not in the hippocampus of OF1 male mice. *Behav Brain Res*, 467, 115023.
- DO, J. P., DEFENSOR, E. B., ICHIM, C. V., LIM, M. A., MECHANIC, J. A., RABE, M. D. & SCHAEVITZ, L. R. 2020. Automated and Continuous Monitoring of Animal Welfare through Digital Alerting. *Comp Med*, 70, 313-327.

- DU PREEZ, A., LAW, T., ONORATO, D., LIM, Y. M., EIBEN, P., MUSAELYAN, K., EGELAND, M., HYE, A., ZUNSZAIN, P. A., THURET, S., PARIANTE, C. M. & FERNANDES, C. 2020. The type of stress matters: repeated injection and permanent social isolation stress in male mice have a differential effect on anxiety- and depressive-like behaviours, and associated biological alterations. *Transl Psychiatry*, 10, 325.
- DÜSSELDORF, H. H. U. 2024. *G*Power* [Online]. Available: <https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower> [Accessed 30.07.2024].
- EHRET, G. 1989. The auditory psychobiology of the mouse - Peripheral anatomy and physiology II.
- ENZO 15.10.2024. *Corticosteron ELISA Kit Product Manual*.
- ENZO. 26.01.2023. *The ABCs of ELISA Assays* [Online]. Available: <https://www.enzo.com/note/which-controls-to-use-in-elisa-assays/> [Accessed 19.06 2024].
- EUROPÄISCHE PARLAMENT & UNION, R. D. E. 2010. RICHTLINIEN 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.
- FEBINGER, H. Y., GEORGE, A., PRIESTLEY, J., TOTH, L. A. & OPP, M. R. 2014. Effects of housing condition and cage change on characteristics of sleep in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 53, 29-37.
- FERNSTRÖM, A. L., FREDLUND, H., SPÅNGBERG, M. & WESTLUND, K. 2009. Positive reinforcement training in rhesus macaques-training progress as a result of training frequency. *Am J Primatol*, 71, 373-9.
- FIGUEIREDO CERQUEIRA, M. M., CASTRO, M. M. L., VIEIRA, A. A., KUROSAWA, J. A. A., AMARAL JUNIOR, F. L. D., SIQUEIRA MENDES, F. C. C. & SOSTHENES, M. C. K. 2023. Comparative analysis between Open Field and Elevated Plus Maze tests as a method for evaluating anxiety-like behavior in mice. *Heliyon*, 9, e14522.
- FREYMANN, J., TSAI, P. P., STELZER, H. & HACKBARTH, H. 2015. The amount of cage bedding preferred by female BALB/c and C57BL/6 mice. *Lab Anim (NY)*, 44, 17-22.
- FU, Q., QIU, R., CHEN, L., CHEN, Y., QI, W. & CHENG, Y. 2023. Music prevents stress-induced depression and anxiety-like behavior in mice. *Transl Psychiatry*, 13, 317.
- GASKILL, B. N., KARAS, A. Z., GARNER, J. P. & PRITCHETT-CORNING, K. R. 2013. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *J Vis Exp*, 51012.
- GELLNER, A. K., SITTER, A., RACKIEWICZ, M., SYLVESTER, M., PHILIPSEN, A., ZIMMER, A. & STEIN, V. 2022. Stress vulnerability shapes disruption of motor cortical neuroplasticity. *Transl Psychiatry*, 12, 91.
- GEMEINSCHAFT, R. D. E. 24.11.1986. Richtlinien des Rates.

- GENDRON, R. L., NESTEL, F. P., LAPP, W. S. & BAINES, M. G. 1990. Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. *J Reprod Fertil*, 90, 395-402.
- GHOSAL, S., NUNLEY, A., MAHBOD, P., LEWIS, A. G., SMITH, E. P., TONG, J., D'ALESSIO, D. A. & HERMAN, J. P. 2015. Mouse handling limits the impact of stress on metabolic endpoints. *Physiol Behav*, 150, 31-7.
- GILLIS, T. E., JANES, A. C. & KAUFMAN, M. J. 2012. Positive reinforcement training in squirrel monkeys using clicker training. *Am J Primatol*, 74, 712-20.
- GONG, S., MIAO, Y. L., JIAO, G. Z., SUN, M. J., LI, H., LIN, J., LUO, M. J. & TAN, J. H. 2015. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One*, 10, e0117503.
- GOURKOW, N., HAMON, S. C. & PHILLIPS, C. J. 2014. Effect of gentle stroking and vocalization on behaviour, mucosal immunity and upper respiratory disease in anxious shelter cats. *Prev Vet Med*, 117, 266-75.
- GOUVEIA, K. & HURST, J. L. 2013. Reducing mouse anxiety during handling: effect of experience with handling tunnels. *PLoS One*, 8, e66401.
- GOUVEIA, K. & HURST, J. L. 2019. Improving the practicality of using non-aversive handling methods to reduce background stress and anxiety in laboratory mice. *Sci Rep*, 9, 20305.
- GRIECO, F., BERNSTEIN, B. J., BIEMANS, B., BIKOVSKI, L., BURNETT, C. J., CUSHMAN, J. D., VAN DAM, E. A., FRY, S. A., RICHMOND-HACHAM, B., HOMBERG, J. R., KAS, M. J. H., KESSELS, H. W., KOOPMANS, B., KRASHES, M. J., KRISHNAN, V., LOGAN, S., LOOS, M., MCCANN, K. E., PARDUZI, Q., PICK, C. G., PREVOT, T. D., RIEDEL, G., ROBINSON, L., SADIGHI, M., SMIT, A. B., SONNTAG, W., ROELOFS, R. F., TEGELENBOSCH, R. A. J. & NOLDUS, L. 2021. Measuring Behavior in the Home Cage: Study Design, Applications, Challenges, and Perspectives. *Front Behav Neurosci*, 15, 735387.
- GUAN, M., MARSCHALL, S., RASPA, M., PICKARD, A. R. & FRAY, M. D. 2012. Overview of new developments in and the future of cryopreservation in the laboratory mouse. *Mammalian Genome*, 23, 572-579.
- GULIN, J. E. N., BISIO, M. & GARCÍA-BOURNISSEN, F. 2020. Refining drug administration in a murine model of acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *Lab Anim Res*, 36, 37.
- HANSEN, S. H. 2015. Biological Samples: Their Composition and Properties, and Their Collection and Storage. *Bioanalysis of Pharmaceuticals*.
- HARRISON, C. 2024. 3R centers tap into the human mindset to bolster replacement, reduction and refinement uptake. *Lab Anim (NY)*, 53, 166-169.
- HERMAN, J. P. & CULLINAN, W. E. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends in Neurosciences*, 20, 78-84.

- HERMAN, J. P., MCKLVEEN, J. M., GHOSAL, S., KOPP, B., WULSIN, A., MAKINSON, R., SCHEIMANN, J. & MYERS, B. 2016. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*.
- HESS, S. E., ROHR, S., DUFOUR, B. D., GASKILL, B. N., PAJOR, E. A. & GARNER, J. P. 2008. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 47, 25-31.
- HIRSCH, M. S. & WATKINS, J. 2020. A Comprehensive Review of Biomarker Use in the Gynecologic Tract Including Differential Diagnoses and Diagnostic Pitfalls. *Adv Anat Pathol*, 27, 164-192.
- HOHLBAUM, K., BERT, B., DIETZE, S., PALME, R., FINK, H. & THÖNE-REINEKE, C. 2017. Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice-Assessing the degree of distress. *PLoS One*, 12, e0179588.
- HOHLBAUM, K., BERT, B., DIETZE, S., PALME, R., FINK, H. & THÖNE-REINEKE, C. 2018. Systematic Assessment of Well-Being in Mice for Procedures Using General Anesthesia. *J Vis Exp*.
- HOHLBAUM, K., KAHNAU, P., WILZOPOLSKI, J. & FISCHER-TENHAGEN, C. 2024. Training Laboratory Rabbits to Refine Routine Husbandry Procedures. *J Vis Exp*.
- HOLY, T. E. & GUO, Z. 2005. Ultrasonic songs of male mice. *PLoS Biol*, 3, e386.
- HURST, J. L. & WEST, R. S. 2010. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods*, 7, 825-6.
- IMOUSE. *intelligent Monitoring & operation system in use within a standardized environment* [Online]. iMouse. Available: <https://imouse.info/our-solution/> [Accessed 01.08.2024].
- JACOBSEN, K. R., JØRGENSEN, P., PIPPER, C. B., STEFFENSEN, A. M., HAU, J. & ABELSON, K. S. P. 2013. The Utility of Fecal Corticosterone Metabolites and Animal Welfare Assessment Protocols as Predictive Parameters of Tumor Development and Animal Welfare in a Murine Xenograft Model. *In Vivo*, 27, 189-196.
- JAFARI, Z., MEHLA, J., AFRASHTEH, N., KOLB, B. E. & MOHAJERANI, M. H. 2017. Corticosterone response to gestational stress and postpartum memory function in mice. *PLoS One*, 12, e0180306.
- JIRKOF, P. 2014. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods*, 234, 139-46.
- JIRKOF, P., FLEISCHMANN, T., CESAROVIC, N., RETTICH, A., VOGEL, J. & ARRAS, M. 2013. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab Anim*, 47, 153-61.
- JIRKOF, P., TOURVIELLE, A., CINELLI, P. & ARRAS, M. 2015. Buprenorphine for pain relief in mice: repeated injections vs sustained-release depot formulation. *Lab Anim*, 49, 177-87.
- JOYCE-ZUNIGA, N. M., NEWBERRY, R. C., ROBBINS, C. T., WARE, J. V., JANSEN, H. T. & NELSON, O. L. 2016. Positive Reinforcement Training for Blood Collection in Grizzly Bears (*Ursus arctos*)

- horribilis) Results in Undetectable Elevations in Serum Cortisol Levels: A Preliminary Investigation. *J Appl Anim Welf Sci*, 19, 210-5.
- KADEN, T., ALONSO-ROMAN, R., AKBARIMOGHADDAM, P., MOSIG, A. S., GRAF, K., RAASCH, M., HOFFMANN, B., FIGGE, M. T., HUBE, B. & GRESNIGT, M. S. 2024. Modeling of intravenous caspofungin administration using an intestine-on-chip reveals altered *Candida albicans* microcolonies and pathogenicity. *Biomaterials*, 307, 122525.
- KALSBECK, A., VAN DER SPEK, R., LEI, J., ENDERT, E., BUIJS, R. M. & FLIERS, E. 2012. Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349, 20-29.
- KENNETH MURPHY, C. W. 2011. *Janeway Immunologie*, Berlin, Heidelberg, Springer Spektrum.
- KEY, D. 2004. Environmental Enrichment Options for Laboratory Rats and Mice. *Lab Animal*, 33, 39-44.
- KOGAN, L., KOLUS, C. & SCHOENFELD-TACHER, R. 2017. Assessment of Clicker Training for Shelter Cats. *Animals (Basel)*, 7.
- KUNCZIK, J., BARBOSA PEREIRA, C., ZIEGLOWSKI, L., TOLBA, R., WASSERMANN, L., HÄGER, C., BLEICH, A., JANSSEN, H., THUM, T. & CZAPLIK, M. 2019. Remote vitals monitoring in rodents using video recordings. *Biomed Opt Express*, 10, 4422-4436.
- KUO, T., MCQUEEN, A., CHEN, T. C. & WANG, J. C. 2015. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol*, 872, 99-126.
- LABORATORIES, C. R. *Growth Chart* [Online]. Available: <https://www.criver.com/products-services/find-model/cd-1r-igs-mouse?region=23> [Accessed 28.06.2024].
- LABS, J. 28.06.2024. *C57BL/6JRj Mouse* [Online]. Available: https://janvier-labs.com/en/fiche_produit/2_c57bl-6jrj_mouse/#onglet__2 [Accessed 28.06.2024].
- LATHAM, N. & MASON, G. 2004. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Applied Animal Behaviour Science*, 86, 261-289.
- LAVAIL, M. M., GORRIN, G. M., REPACI, M. A. & YASUMURA, D. 1987. Light-induced retinal degeneration in albino mice and rats: strain and species differences. *Prog Clin Biol Res*, 247, 439-54.
- LEE, P. R., BRADY, D. L., SHAPIRO, R. A., DORSA, D. M. & KOENIG, J. I. 2007. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res*, 1156, 152-67.
- LEENAARS, C. H. C., VAN DER MIERDEN, S., DURST, M., GOERLICH-JANSSON, V. C., RIPOLI, F. L., KEUBLER, L. M., TALBOT, S. R., BOYLE, E., HABEDANK, A., JIRKOF, P., LEWEJOHANN, L., GASS, P., TOLBA, R. & BLEICH, A. 2020. Measurement of corticosterone in mice: a protocol for a mapping review. *Lab Anim*, 54, 26-32.

- LEIDINGER, C., HERRMANN, F., THÖNE-REINEKE, C., BAUMGART, N. & BAUMGART, J. 2017. Introducing Clicker Training as a Cognitive Enrichment for Laboratory Mice. *J Vis Exp*.
- LEIDINGER, C. S., KAISER, N., BAUMGART, N. & BAUMGART, J. 2018. Using Clicker Training and Social Observation to Teach Rats to Voluntarily Change Cages. *J Vis Exp*.
- LEIDINGER, C. S., THÖNE-REINEKE, C., BAUMGART, N. & BAUMGART, J. 2019. Environmental enrichment prevents pup mortality in laboratory mice. *Lab Anim*, 53, 53-62.
- LENG, S. X., MCELHANEY, J. E., WALSTON, J. D., XIE, D., FEDARKO, N. S. & KUCHEL, G. A. 2008. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63, 879-84.
- LEVY, D. R., HUNTER, N., LIN, S., ROBINSON, E. M., GILLIS, W., CONLIN, E. B., ANYOHA, R., SHANSKY, R. M. & DATTA, S. R. 2023. Mouse spontaneous behavior reflects individual variation rather than estrous state. *Curr Biol*, 33, 1358-1364 e4.
- LI, Y., XIAO, X., WANG, L., WANG, Q., LIANG, R., ZHENG, C., YANG, J. & MING, D. 2022. Comparison effects of chronic sleep deprivation on juvenile and young adult mice. *J Sleep Res*, 31, e13399.
- LIDFORS LM, F. N., ANDERSON C AND ZUPAN ŠEMROV M 2021. Investigating the Reward Cycle of Play in Pigs (*Sus scrofa*). *Front. Anim. Sci.* .
- LIU, M.-Y., YIN, C.-Y., ZHU, L.-J., ZHU, X.-H., XU, C., LUO, C.-X., CHEN, H., ZHU, D.-Y. & ZHOU, Q.-G. 2018. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*, 13, 1686-1698.
- LYNCH, C. J. 1969. The so-called Swiss mouse. *Lab Anim Care*, 19, 214-20.
- MÄHLER CONVENOR, M., BERARD, M., FEINSTEIN, R., GALLAGHER, A., ILLGEN-WILCKE, B., PRITCHETT-CORNING, K. & RASPA, M. 2014. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*, 48, 178-192.
- MÄHLIS, G., KLEINE, A., LÜSCHOW, D., BARTEL, A., WIEGARD, M. & THOENE-REINEKE, C. 2023. Clicker Training as an Applied Refinement Measure in Chickens. *Animals (Basel)*, 13.
- MALLICK, S., KUMAR, B. B., PRAKASH, B. S., AGRAWAL, A. & PANDITA, S. 2015. Development and validation of a simple, sensitive enzyme immunoassay for quantification of androstenedione in bull plasma. *J Anim Sci Technol*, 57, 13.
- MARCHETTE, R. C. N., BICCA, M. A., SANTOS, E. & DE LIMA, T. C. M. 2018. Distinctive stress sensitivity and anxiety-like behavior in female mice: Strain differences matter. *Neurobiol Stress*, 9, 55-63.
- MARCOTTE, M., BERNARDO, A., LINGA, N., PÉREZ-ROMERO, C. A., GUILLOU, J. L., SIBILLE, E. & PREVOT, T. D. 2021. Handling Techniques to Reduce Stress in Mice. *J Vis Exp*.

- MEANEY, C., DAS, S., COLAK, E. & KOHANDEL, M. 2023. Deep learning characterization of brain tumours with diffusion weighted imaging. *J Theor Biol*, 557, 111342.
- MEANEY, M. J., SZYF, M. & SECKL, J. R. 2007. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol Med*, 13, 269-77.
- MEIJER, M. K., KRAMER, K., REMIE, R., SPRUIJT, B. M., VAN ZUTPHEN, L. F. M. & BAUMANS, V. 2006. The effect of routine experimental procedures on physiological parameters in mice kept under different husbandry conditions. *Animal Welfare*, 15, 31-38.
- MELGAR-LOCATELLI, S., MANAS-PADILLA, M. C., CASTRO-ZAVALA, A., RIVERA, P., DEL CARMEN RAZOLA-DIAZ, M., MONJE, F. J., RODRIGUEZ-PEREZ, C. & CASTILLA-ORTEGA, E. 2024. Diet enriched with high-phenolic cocoa potentiates hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis in healthy adult micewith subtle effects on memory. *Food Funct*, 15, 8310-8329.
- MIEBACH, L., BERNER, J. & BEKESCHUS, S. 2022. In ovo model in cancer research and tumor immunology. *Front Immunol*, 13, 1006064.
- MIESKE, P., HOBBIESIEFKEN, U., FISCHER-TENHAGEN, C., HEINL, C., HOHLBAUM, K., KAHNAU, P., MEIER, J., WILZOPOLSKI, J., BUTZKE, D., RUDECK, J., LEWEJOHANN, L. & DIEDERICH, K. 2022. Bored at home?-A systematic review on the effect of environmental enrichment on the welfare of laboratory rats and mice. *Front Vet Sci*, 9, 899219.
- MORRIS, R. G. M. 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12, 239-260.
- NEELY, C. L. C., PEDEMONTE, K. A., BOGGS, K. N. & FLINN, J. M. 2019. Nest Building Behavior as an Early Indicator of Behavioral Deficits in Mice. *J Vis Exp*.
- NISHIGAWA, T., NAGAMACHI, S., IKEDA, H., CHOWDHURY, V. S. & FURUSE, M. 2018. Restraint stress in lactating mice alters the levels of sulfur-containing amino acids in milk. *J Vet Med Sci*, 80, 503-509.
- NOWACKA-CHMIELEWSKA, M., GRABOWSKA, K., GRABOWSKI, M., MEYBOHM, P., BUREK, M. & MAŁECKI, A. 2022. Running from Stress: Neurobiological Mechanisms of Exercise-Induced Stress Resilience. *Int J Mol Sci*, 23.
- OFFERMANN, S. 2020. Glucocorticoide. *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- OH, H. J., SONG, M., KIM, Y. K., BAE, J. R., CHA, S. Y., BAE, J. Y., KIM, Y., YOU, M., LEE, Y., SHIM, J. & MAENG, S. 2018. Age-Related Decrease in Stress Responsiveness and Proactive Coping in Male Mice. *Front Aging Neurosci*, 10, 128.
- OKAMURA, H., YASUGAKI, S., SUZUKI-ABE, H., ARAI, Y., SAKURAI, K., YANAGISAWA, M., TAKIZAWA, H. & HAYASHI, Y. 2022. Long-Term Effects of Repeated Social Defeat Stress on Brain Activity during Social Interaction in BALB/c Mice. *eNeuro*, 9.

- PANKSEPP, J. & BURGDORF, J. 2000. 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behav Brain Res*, 115, 25-38.
- PAREDES-RAMOS, P., DIAZ-MORALES, J. V., ESPINOSA-PALENCIA, M., CORIA-AVILA, G. A. & CARRASCO-GARCIA, A. A. 2020. Clicker Training Accelerates Learning of Complex Behaviors but Reduces Discriminative Abilities of Yucatan Miniature Pigs. *Animals (Basel)*, 10.
- PARIS, J. J., BRUNTON, P. J., RUSSELL, J. A. & FRYE, C. A. 2011. Immune stress in late pregnant rats decreases length of gestation and fecundity, and alters later cognitive and affective behaviour of surviving pre-adolescent offspring. *Stress*, 14, 652-64.
- PAVLOV, P. I. 1927. Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Annals of neurosciences*, 17, 136-41.
- PERLMAN, J. E., BLOOMSMITH, M. A., WHITTAKER, M. A., MCMILLAN, J. L., MINIER, D. E. & MCCOWAN, B. 2012. Implementing positive reinforcement animal training programs at primate laboratories. *Applied Animal Behaviour Science*, 137, 114-126.
- PRIMATENZENTRUM, D. 2024. *Abteilung Funktionelle Bildgebung* [Online]. Available: <https://www.dpz.eu/de/abteilung/funktionelle-bildgebung/ueber-uns.html> [Accessed 30.07.2024].
- PRIMO, M. J., FONSECA-RODRIGUES, D., ALMEIDA, A., TEIXEIRA, P. M. & PINTO-RIBEIRO, F. 2023. Sucrose preference test: A systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents. *European Neuropsychopharmacology*, 77, 80-92.
- RADYUSHKIN, K., HAMMERSCHMIDT, K., BORETIUS, S., VAROQUEAUX, F., EL-KORDI, A., RONNENBERG, A., WINTER, D., FRAHM, J., FISCHER, J., BROSE, N. & EHRENREICH, H. 2009. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav*, 8, 416-25.
- RALPH, C. R. & TILBROOK, A. J. 2016. INVITED REVIEW: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *J Anim Sci*, 94, 457-70.
- RASMUSSEN, S., MILLER, M. M., FILIPSKI, S. B. & TOLWANI, R. J. 2011. Cage change influences serum corticosterone and anxiety-like behaviors in the mouse. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 50, 479-83.
- RATUSKI, A. S., AMENDOLA, L., MAKOWSKA, I. J. & WEARY, D. M. 2024. Effects of temporary access to environmental enrichment on measures of laboratory mouse welfare. *Sci Rep*, 14, 15143.
- REPUBLICAN, T. S. W. 1913. *The Mouse Fancier of Granby*.
- RINWA, P., ERIKSSON, M., COTGREAVE, I. & BÄCKBERG, M. 2024. 3R-Refinement principles: elevating rodent well-being and research quality. *Laboratory Animal Research*, 40, 11.

- RISIKOBEWERTUNG, B. B. F. 2024a. *Verwendung von Versuchstieren im Berichtsjahr 2022* [Online]. Available: https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2022-313306.html [Accessed 04.06.2024 2024].
- RISIKOBEWERTUNG, B. F. 2024b. *Verwendung von Versuchstieren im Berichtsjahr 2022* [Online]. Available: <https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.bf3r.de%2Fcm%2F343%2Fzahlen-zu-den-2022-in-deutschland-verwendeten-versuchstieren.xlsx&wdOrigin=BROWSELINK> [Accessed 23.07.024].
- RIVER, C. 2024a. *Our History* [Online]. Available: <https://www.criver.com/about-us/about-us-overview/our-story/our-history?region=3696> [Accessed 24.07.24].
- RIVER, C. 2024b. *Outbred Mice* [Online]. Available: https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/OutbredMiceDatasheet.pdf [Accessed 24.07.24].
- ROETH, A. A., GARRETSON, I., BELTZ, M., HERBOLD, T., SCHULZE-HAGEN, M., QUAISSER, S., GEORGENS, A., REITH, D., SLABU, I., KLINK, C. D., NEUMANN, U. P. & LINKE, B. S. 2021. 3D-Printed Replica and Porcine Explants for Pre-Clinical Optimization of Endoscopic Tumor Treatment by Magnetic Targeting. *Cancers (Basel)*, 13.
- RUDECK, J., VOGL, S., HEINL, C., STEINFATH, M., FRITZWANKER, S., KLIOWER, A., SCHULZ, S., SCHÖNFELDER, G. & BERT, B. 2020. Analgesic treatment with buprenorphine should be adapted to the mouse strain. *Pharmacol Biochem Behav*, 191, 172877.
- SCHALBETTER, S. M., MUELLER, F. S., SCARBOROUGH, J., RICETTO, J., WEBER-STADLBAUER, U., MEYER, U. & NOTTER, T. 2021. Oral application of clozapine-N-oxide using the micropipette-guided drug administration (MDA) method in mouse DREADD systems. *Lab Anim (NY)*, 50, 69-75.
- SCHENKEL, J. 2006. *Transgene Tiere*, Springer Berlin Heidelberg.
- SCHERMER, F. J. 2006. *Lernen und Gedächtnis* w. kohlhammer Druckerei GmbH + Co. KG.
- SCHWENDENER, S., MEYER, U. & FELDON, J. 2009. Deficient maternal care resulting from immunological stress during pregnancy is associated with a sex-dependent enhancement of conditioned fear in the offspring. *J Neurodev Disord*, 1, 15-32.
- SERRADAS, M. L., STEIN, V. & GELLNER, A. K. 2022. Long-term changes of parvalbumin- and somatostatin-positive interneurons of the primary motor cortex after chronic social defeat stress depend on individual stress-vulnerability. *Front Psychiatry*, 13, 946719.
- SET, S. 2024. *3R-Methoden* [Online]. Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Einschränkung von Tierversuchen. Available: <https://www.stiftung-set.de/3r-forschung/3r-methoden/> [Accessed 30.07.2024].
- SHIMKIN, M. B. 1975. A. E. C. Lathrop (1868-1918): Mouse Woman of Granby. *Cancer Res*, 35, 1597-8.

- SIRASANGI, M. I., ROOHI, T. F., KRISHNA, K. L., KINATTINGAL, N., WANI, S. U. D. & MEHDI, S. 2024. Dietary Co-supplements attenuate the chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice. *Behavioural Brain Research*, 459, 114788.
- SKINNER, B. F. 1938. *The behavior of organisms: an experimental analysis*, Oxford, England, Appleton-Century.
- SMITH, S. M. & VALE, W. W. 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*, 8, 383-95.
- SOLANO, M. E. & ARCK, P. C. 2019. Steroids, Pregnancy and Fetal Development. *Front Immunol*, 10, 3017.
- SØRENSEN, D. B., DRAGSTED, N. & GLERUP, P. 2011. Positive reinforcement training in large experimental animals. *Altex*, 28, 250.
- SPENCER, R. L. & DEAK, T. 2017. A users guide to HPA axis research. *Physiol Behav*, 178, 43-65.
- STEENSMA, D. P., KYLE, R. A. & SHAMPO, M. A. 2010. Abbie Lathrop, the "mouse woman of Granby": rodent fancier and accidental genetics pioneer. *Mayo Clin Proc*, 85, e83.
- STREKALOVA, T., SPANAGEL, R., BARTSCH, D., HENN, F. A. & GASS, P. 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*, 29, 2007-17.
- TAGAWA, N., MORI, K., KOEBIS, M., AIBA, A., IINO, Y., TSUNEOKA, Y. & FUNATO, H. 2024. Activation of lateral preoptic neurons is associated with nest-building in male mice. *Scientific Reports*, 14, 8346.
- TAITT, K. T. & KENDALL, L. V. 2019. Physiologic Stress of Ear Punch Identification Compared with Restraint Only in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 58, 438-442.
- TOUMA, C., PALME, R. & SACHSER, N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior*, 45, 10-22.
- TSAI, P. P., SCHLICHTIG, A., ZIEGLER, E., ERNST, H., HABERSTROH, J., STELZER, H. D. & HACKBARTH, H. 2015. Effects of different blood collection methods on indicators of welfare in mice. *Lab Anim (NY)*, 44, 301-10.
- TSUCHIMINE, S., MATSUNO, H., O'HASHI, K., CHIBA, S., YOSHIMURA, A., KUNUGI, H. & SOHYA, K. 2020. Comparison of physiological and behavioral responses to chronic restraint stress between C57BL/6J and BALB/c mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525, 33-38.
- UENO, H., TAKAHASHI, Y., SUEMITSU, S., MURAKAMI, S., KITAMURA, N., WANI, K., MATSUMOTO, Y., OKAMOTO, M. & ISHIHARA, T. 2020. Effects of repetitive gentle handling of male C57BL/6NCrI mice on comparative behavioural test results. *Scientific Reports*, 10, 3509.

- VAN DE WEERD, H. A., BAUMANS, V., KOOLHAAS, J. M. & VAN ZUTPHEN, L. F. 1994. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *J Exp Anim Sci*, 36, 117-27.
- VAN DER MIERDEN, S., LEENAARS, C. H. C., BOYLE, E. C., RIPOLI, F. L., GASS, P., DURST, M., GOERLICH-JANSSON, V. C., JIRKOF, P., KEUBLER, L. M., TALBOT, S. R., HABEDANK, A., LEWEJOHANN, L., TOLBA, R. H. & BLEICH, A. 2021. Measuring endogenous corticosterone in laboratory mice - a mapping review, meta-analysis, and open source database. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 38, 111-122.
- VAN LOO, P. L., MOL, J. A., KOOLHAAS, J. M., VAN ZUTPHEN, B. F. & BAUMANS, V. 2001. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol Behav*, 72, 675-83.
- VAN LOO, P. L., VAN DE WEERD, H. A., VAN ZUTPHEN, L. F. & BAUMANS, V. 2004. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab Anim*, 38, 178-88.
- VOIPIO, H. M., NEVALAINEN, T., HALONEN, P., HAKUMÄKI, M. & BJÖRK, E. 2006. Role of cage material, working style and hearing sensitivity in perception of animal care noise. *Lab Anim*, 40, 400-9.
- VORHEES, C. V. & WILLIAMS, M. T. 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*, 1, 848-58.
- W. M. S. RUSSELL, R. L. B. 1959. *The principles of human experimental technique*, Mathuen, London.
- WEISS, E., MILLER, K., MOHAN-GIBBONS, H. & VELA, C. 2012. Why Did You Choose This Pet?: Adopters and Pet Selection Preferences in Five Animal Shelters in the United States. *Animals (Basel)*, 2, 144-59.
- WERNER, J. 2024. Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen. *Technische Universität München*.
- WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P. & MAZUR, P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*, 178, 411-4.
- WIEBOLD, J. L., STANFIELD, P. H., BECKER, W. C. & HILLERS, J. K. 1986. The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. *J Reprod Fertil*, 78, 185-92.
- WILL, T. R., PROAÑO, S. B., THOMAS, A. M., KUNZ, L. M., THOMPSON, K. C., GINNARI, L. A., JONES, C. H., LUCAS, S. C., REAVIS, E. M., DORRIS, D. M. & MEITZEN, J. 2017. Problems and Progress regarding Sex Bias and Omission in Neuroscience Research. *eNeuro*, 4.
- WILLIAMSON, C. M., LEE, W., DECASIEN, A. R., LANHAM, A., ROMEO, R. D. & CURLEY, J. P. 2019. Social hierarchy position in female mice is associated with plasma corticosterone levels and hypothalamic gene expression. *Scientific Reports*, 9, 7324.
- WOLFER, D. P., LITVIN, O., MORF, S., NITSCH, R. M., LIPP, H. P. & WÜRBEL, H. 2004. Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour. *Nature*, 432, 821-2.
- WOODWORTH, R. S. 1950. Edward Lee Thorndike: 1874-1949. *Science*, 111, 250-251.

- WULFF, A. B., COOPER, P., KODJO, E., ABEL, E. & THOMPSON, S. M. 2023. How Sucrose Preference Is Gained and Lost: An In-Depth Analysis of Drinking Behavior during the Sucrose Preference Test in Mice. *eNeuro*, 10.
- XIONG, X. D., XIONG, W. D., XIONG, S. S. & CHEN, G. H. 2018. Age- and Gender-Based Differences in Nest-Building Behavior and Learning and Memory Performance Measured Using a Radial Six-Armed Water Maze in C57BL/6 Mice. *Behav Neurol*, 2018, 8728415.
- YUK, K. H., LEE, S. M., BAE, W. R., PARK, J. Y., WOO, S. W., SONG, P., JEONG, I. C., KIM, J.-S. & MOON, H. Y. 2023. Distinct effect of exercise modes on mood-related behavior in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 646, 36-43.
- ZHANG, K., LIN, W., ZHANG, J., ZHAO, Y., WANG, X. & ZHAO, M. 2020. Effect of Toll-like receptor 4 on depressive-like behaviors induced by chronic social defeat stress. *Brain Behav*, 10, e01525.
- ZOPLUS. *Klicker mit Target Stick, Trixi* [Online]. Available: https://www.zooplus.de/shop/nager_kleintiere/spielzeug/zwergkaninchen/201889?variantId=201889.0&mkt_source=1573769&msclid=55ad6e5dfac21feef9bc0807f62edf25&activeVariant=201889.0 [Accessed 22.10.2024].

10. PUBLIKATIONSLISTE

10.1 PRÄSENTATIONEN (ORAL):

Reichel, S. (2021): *Der Einfluss des Klickertrainings bei verschiedenen Mausstämmen und dessen Langzeitwirkung beim CD1 Stramm.* 59. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) und der 20. Interessensgemeinschaft der Tierpfleger (IGTP) 22.09.21 -24.09.21

Reichel, S. (2023): *The Long-term Benefit of Clicker Training in Crl:ICR(CD1) Female Mice.* 60. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) und der 21. Interessensgemeinschaft der Tierpfleger (IGTP) 06.09.23 -08.09.23

10.2 PRÄSENTATION (POSTER):

Reichel, S., Baumgart, N., Baumgart, J. (2021): *Der Einfluss des Klickertrainings bei verschiedenen Mausstämmen und dessen Langzeitwirkung beim CD1 Stramm.* 59. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) und der 20. Interessensgemeinschaft der Tierpfleger (IGTP) 22.09.21 -24.09.21

Reiche, S., Wybranitz, L., Stumm, K., Baumgart, J., Baumgart, N., (2023): *Tickling as a reward? Laughing rats make it possible.* 60. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) und der 21. Interessensgemeinschaft der Tierpfleger (IGTP) 06.09.23 -08.09.23

11. LEBENSLAUF

12. DANKSAGUNG

13. VERSICHERUNG

Markierung Maus (Ohrlochung, allgemein)

Ohrstanzung (Nr.: 1 - 99)

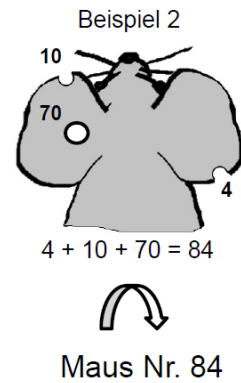
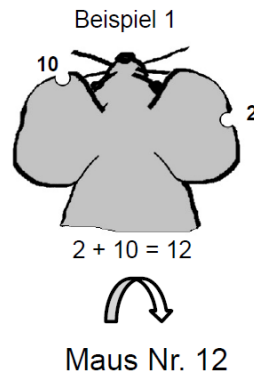
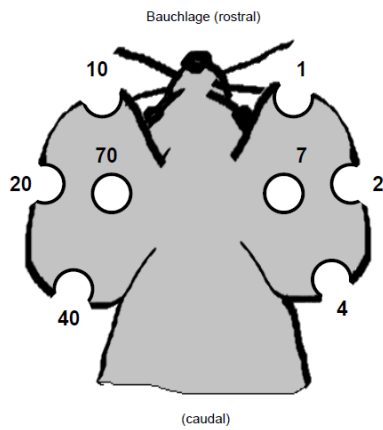


Abbildung 76: Ohrstanzenmarkierung.

Maus - Zucht

“fortified“ (autoklavierbar / γ -bestrahlt)

Alleinfuttermittel für Mäuse (& Ratten)

ssniff



Beschreibung

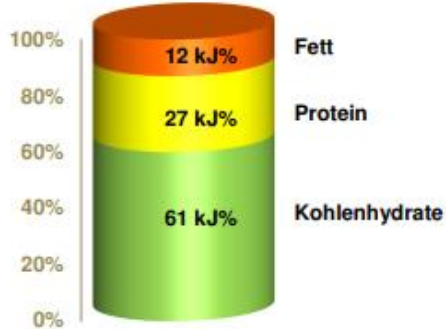
Dieses Futtermittel ist für die Zucht von Mäusen vorgesehen; es ist partiell auch für Ratten geeignet. Der Nährstoffgehalt und die Energiedichte wurden angehoben, um den Bedarf bei hoher Reproduktionsleistung zu decken.

Dieses Futter ist zur ad libitum Fütterung vorgesehen. Den Tieren stets frisches Wasser anbieten

Bruttoenergie (GE) 16,7 MJ/kg
Umsetzbare Energie (ME) ¹⁾ 14,0 MJ/kg

¹⁾ = Physiologischer Brennwert (Atwater);
 entspricht 3.338 kcal/kg

ME - Schwein = 13,6 MJ/kg (alt: 13,6 MJ/kg)



Rohnährstoffe	[%]
Rohprotein (N x 6,25)	22,0
Rohfett	4,5
Rohfaser	3,9
NDF	13,1
ADF	6,0
Rohasche	6,5
Stärke	34,2
Zucker	5,1
N freie Extraktstoffe	51,2

Mineralstoffe	[%]
Calcium	1,00
Phosphor	0,70
Ca / P	1,43 : 1
Natrium	0,24
Magnesium	0,21
Kalium	0,98

Fettsäuren	[%]
C 12:0	—
C 14:0	0,01
C 16:0	0,54
C 18:0	0,14
C 20:0	0,02
C 16:1	0,02
C 18:1	1,03
C 18:2	2,42
C 18:3	0,28

Aminosäuren	[%]
Lysin	1,48
Methionin	0,50
Cystin	0,39
Met+Cys	0,89
Threonin	0,83
Tryptophan	0,28
Arginin	1,38
Histidin	0,57
Valin	1,06
Isoleucin	0,95
Leucin	1,67
Phenylalanin	1,04
Phe+Tyr	1,77
Glycin	0,98
Glutaminsäure	4,56
Asparaginsäure	2,20
Prolin	1,38
Serin	1,17
Alanin	1,01

Vitamine	pro	kg
Vitamin A	25.000	IU
Vitamin D ₃	1.500	IU
Vitamin E	135	mg
Vitamin K (als MNB)	20	mg
Thiamin (B ₁)	86	mg
Riboflavin (B ₂)	33	mg
Pyridoxin (B ₆)	31	mg
Cobalamin (B ₁₂)	150	µg
Nikotinsäure	140	mg
Pantothensäure	59	mg
Folsäure	10	mg
Biotin	690	µg
Cholin	1.400	mg

Spurenelemente	pro	kg
Eisen	192	mg
Mangan	64	mg
Zink	91	mg
Kupfer	15	mg
Iod	2,1	mg
Selen	0,3	mg

Zusammensetzung

Weizen und Weizenprodukte, Sojaprodukte, Mais, Mineralstoffe, Sojaöl, Bierhefe, Vitamine & Spurenelemente, L-Lysin HCl, DL-Methionin.

Hauptprodukte	Abpackung
V1124-300 10 mm, autoklavierbar	10 kg
V1124-703 10 mm, γ -bestrahlt 25 kGy	10 kg + PE
V1124-727 10 mm, γ -bestrahlt 25 kGy	5 x 3 kg Vacubag

Herstellung und Vertrieb
 ssniff Spezialitäten GmbH
 Telefon: +49-(0)2921-9658-0
 Fax: +49-(0)2921-9658-40
 E-Mail: mail@ssniff.de
www.ssniff.de / www.ssniff.com

Abbildung 77: Standardisiertes Haltungsfutter von ssniff und dessen Inhaltsstoffe.

Klickereinführung: 10 Minuten Uhrzeit:		
Lab-ID	ID	Time [s]

Abbildung 80: Protokollierung der Klickereinführung.

Klickertraining		00.211 Raum	220 Lux	Wartekäfig steht im Flur	
ID	Lab-ID	Datum	Datum	Datum	Datum
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4

Abbildung 81: Protokollierung des Klickertrainings.

Sucrose Preference Test										
preference=		(sucrose intake/total intake)x100%								
total intake =		sucrose intake + water intake								
Mutter: Tier-ID		Gramm [g]								
Lab ID	ID	H2O Start	H2O Ende	Getrunken	1% Start	1% Ende	Getrunken	total intake	preference sucrose [%]	preference water [%]

Abbildung 84: Berechnung der Protokollierung der Gewichtsmessung von dem Saccharose Präferenztest.

Ansetzen der 1 %igen Saccharoselösung

Materialien:

- Becherglas 2000 mL
- Spatel zum Rühren
- D(+)-Saccharose
- Wägeschalen
- Waage
- 2 Flaschen pro Käfig/Maus mit autoklaviertem Wasser 250 mL

Durchführung:

- Das benötigte Gewicht sollte zuvor berechnet werden.
- Es wird ein Wägeschälchen auf die Waage gelegt und Tara gedrückt.
- Die Saccharose kann in das Wägeschälchen vorsichtig geschüttet werden.
- Danach das autoklavierte Wasser aus den Flaschen in das Becherglas schütten.
- Die entsprechende Menge an Saccharose dazugeben und so lange rühren bis es sich komplett aufgelöst hat.
- Die Saccharoselösung wieder zurück in die Flaschen verteilen. Darauf achten, dass die Flasche dicht ist.
- Die Flaschen mit der Saccharoselösung beschriften (grüner Klebepunkt).
- Beide Flaschen im Käfig platzieren.
- Versuch kann begonnen werden.

Rechenbeispiel:

2000 mL autoklaviertes Wasser → 1 %igen Saccharoselösung

2000 mL entsprechen 2000 g

$$\begin{array}{rcl}
 2000 \text{ g} & - & 100 \% \\
 : 100 & \curvearrowright & \\
 20 \text{ g} & - & 1 \% \\
 & & \curvearrowleft : 100
 \end{array}$$

Abbildung 85: Rechenbeispiel zum Ansetzen der 1 %igen Saccharoselösung.

In das Becherglas mit 2000 mL Wasser müssen 20 g Saccharose hinzugefügt werden, um eine 1 %igen Lösung zu erhalten.

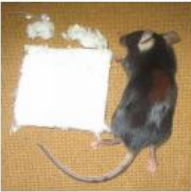
Nest Building Test			
Mutter:Tier ID			
ID	Lab-ID	Nest Score	Gramm

BOX 1 | Rating scale


1. Nestlet not noticeably touched (more than 90% intact).
2. Nestlet partially torn (50–90% remaining intact).
3. Nestlet mostly shredded but often no identifiable nest site: less than 50% of the Nestlet remains intact, but less than 90% is within a quarter of the cage floor area; i.e., the cotton is not gathered into a nest but is spread around the cage. The material may sometimes be in a broadly defined nest area, but the critical definition here is that 50–90% has been shredded.
4. An identifiable but flat nest: more than 90% of the Nestlet is torn and the material is gathered into a nest within a quarter of the cage floor area, but the nest is flat, with walls higher than mouse body height (of a mouse curled up on its side) for less than 50% of its circumference.
5. A (near) perfect nest: more than 90% of the Nestlet is torn and the nest is a crater, with walls higher than mouse body height for more than 50% of its circumference.

Nest building is a complex interaction between the animal and its environment and inevitably will be very variable. For example, some mice may build what looks like a 'grade 5' nest and still leave more than 10% of the Nestlet unshredded. At Oxford, when criteria do not agree, we 'split the difference'. For example, a perfect nest with an unshredded 0.7-g piece might be assigned a score of 4.5. We consider this to be the best compromise in assessing a complex behavior. (Behavioral work often resembles clinical work in such issues of complexity and individual variability.) Another group, however, may wish to base their scoring entirely on the shape of the nest and use the weight of the untorn material as an entirely separate measure. Nest-scoring examples are provided in **Figure 1**.


a




b



c



d



e




Abbildung 86: Protokollierung des Nestbauverhaltenstests.

• CORTICOSTERONE PLATE LAYOUT:

A1 Blank	A2 Std 1	A3 Std 5	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1 Blank	B2 Std 1	B3 Std 5	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1 TA	C2 Std 2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1 TA	D2 Std 2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1 NSB	E2 Std 3	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1 NSB	F2 Std 3	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1 Bo	G2 Std 4	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1 Bo	H2 Std 4	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Kit Lot No. _____ Exp. Date _____ Date _____ Tech. _____

1st Incub.: Start Time _____ Temp. _____ Notes: _____

End Time _____ Temp. _____

2nd Incub.: Start Time _____ Temp. _____

End Time _____ Temp. _____

Abbildung 87: Corticosteron Assay Layout Vorlage.

CORTICOSTERONE ASSAY LAYOUT SHEET

for use with Enzo Life Sciences Catalog Nos. ADI-900-097 and ADI-901-097

DILUTION TABLE FOR MAKING STANDARDS 1-5:

Std.	Diluent Vol. (µL)	Vol. Added (µL)	Corticosterone Conc. (pg/mL)
1	900	100, Stock	20,000
2	800	200, Std. 1	4,000
3	800	200, Std. 2	800
4	800	200, Std. 3	160
5	800	200, Std. 4	32

ASSAY PROTOCOL FLOW CHART:

Well I.D.:	Blank A1, B1	TA C1, D1	NSB E1, F1	Bo G1, H1	Stds. A2 - B3	Samples C3 - H12
Standard Diluent	---	---	100 µL	100 µL	---	---
Assay Buffer 15	---	---	50 µL	---	---	---
Std. and/or Sample	---	---	---	---	100 µL	100 µL
Conjugate	---	---	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Antibody	---	---	---	50 µL	50 µL	50 µL
Incub. 2 hours @ RT, shaking	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒
Asp. & Wash 3 x 400 µL	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒
Conjugate	---	5 µL	---	---	---	---
Substrate	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Incub. 1 hour @ RT	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒
Stop Solution	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Abbildung 88: Verdünnungstabelle für die Standards und das Pipettierschema.

Der Einfluss des Klickertrainings bei verschiedenen Mausstämmen und dessen Langzeitwirkung beim CD1 Stamm

Sandra Reichel, Nadine Baumgart, Jan Baumgart

Translational Animal Research Center, Universitätsmedizin, Mainz, Deutschland

Einführung

Das Wohlergehen der Tiere für wissenschaftlichen Zwecke gewinnt immer mehr an Bedeutung. Unter anderem wurde gezeigt, dass nicht invasives Handling der Tiere nicht nur zu einer Reduzierung von Angst und Stress führt, sondern auch zur Verbesserung der Versuchsergebnisse. Dadurch kann die Anzahl der Versuchstiere minimiert und deren Wohlbefinden verbessert werden. Dies ist ganz im Sinne der **3R Prinzipien** (Reduce, Refine, Replace) und beruht auf der Grundlage der RICHTLINIEN 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES **Artikel 4 Grundsatz der Vermeidung, Verminderung und Verbesserung**. Das Klickertraining soll als Enrichment genutzt werden, um dem Tier ein bestimmtes Verhalten durch positive Verstärkung anzutrainieren. Es soll untersucht werden, ob es stammspezifische Unterschiede und einen Langzeiteffekt gibt. Können sich die Tiere nach einer längeren Trainingspause (Tag 0, nach 1 Monat, nach 3 Monaten, nach 6 Monaten) besser an das erlernte Verhalten erinnern?

Methode



Abbildung 1: Klickertraining

Vor dem Beginn und am Ende des Trainings wird ein Test auf Interaktion durchgeführt. Bei diesem soll die Bereitschaft der Tiere zur Kommunikation mit dem Experimentator untersucht werden und welchen Einfluss das Klickertraining darauf hat. Anschließend werden die Tiere über zwei Tage an die Belohnung (weiße Schokoladencreme) gewöhnt. Nach einer Klickereinführung bei dem die Verbindung zwischen Klick und gewünschtem Verhalten entsteht, findet das eigentliche Training statt, welches aus drei Phasen besteht: 1. Akklimation, 2. Training und 3. Pause (siehe Abbildung 1). Die Trainingsphase und Pause werden drei mal wiederholt.

Ergebnisse

Vergleich Stämme

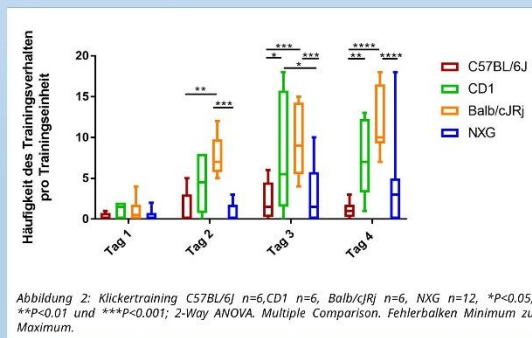


Abbildung 2: Klickertraining C57BL/6j n=6, CD1 n=6, Balb/cJrj n=6, NXG n=12, *P<0,05, **P<0,01 und ***P<0,001; 2-Way ANOVA. Multiple Comparison. Fehlerbalken Minimum zu Maximum.

Langzeitwirkung bei dem CD1 Stamm

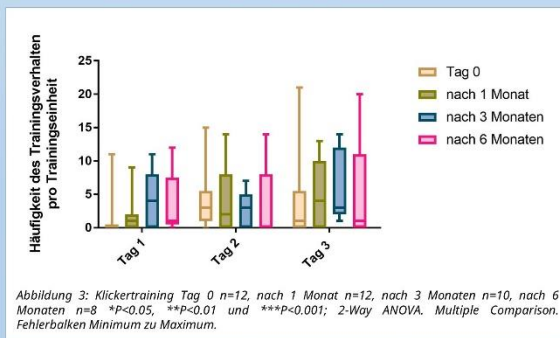


Abbildung 3: Klickertraining Tag 0 n=12, nach 1 Monat n=12, nach 3 Monaten n=10, nach 6 Monaten n=8 *P<0,05, **P<0,01 und ***P<0,001; 2-Way ANOVA. Multiple Comparison. Fehlerbalken Minimum zu Maximum.

Schlussfolgerung

Anhand der durchgeführten Experimente können wir die Aussage treffen, dass sich jeder Stamm trainieren lässt. Jedoch gibt es stammspezifische Unterschiede. Bei dem CD1 sowie Balb/c Stamm kann die Trainingszeit sogar von vier auf drei Tage verkürzt werden. Der C57BL/6j und NXG Stamm hingegen benötigen einen längeren Trainingszeitraum. Des Weiteren kann die Aussage getroffen werden, dass die Tiere durch das Training mehr mit dem Experimentator interagieren und weniger Angst zeigen, wodurch sich die Handhabung verbessern lässt. Auch die von uns untersuchte Langzeitwirkung des Klickertrainings auf den CD1 Stamm zeigt, dass sich die Tiere innerhalb einer Pause von drei Monaten immer noch an das erlernte Verhalten erinnern können. Dies spiegelt sich in der Häufigkeit des Trainingsverhaltens wieder, die bereits ab Tag eins zunimmt. Ist die Pause länger als drei Monate, so ist eine Tendenz zur Abnahme des trainierten Verhaltens zu erkennen.

Referenzen

J.Hurst (2010). Taming anxiety in laboratory mice, Nature Methods Vol.7 No.10, 825-828. doi:10.1038/nmeth.1500

C.Leidinger (2017). Introducing Clicker Training as a Cognitive Enrichment for Laboratory Mice. J. Vis. Exp. (121), e55415, doi:10.3791/55415

Abbildung 89: Posterpräsentation (2021) von der 59. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) und der 20. Interessensgemeinschaft der Tierpfleger (IGTP).

Tickling as a Reward? Laughing Rats make it possible!

Reichel S., Wybranitz L., Stumm K., Baumgart J., Baumgart N.

Translational Animal Research Center, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

Introduction

Clicker training has been successfully used in animal research as a refinement strategy to improve the welfare of laboratory rodents (Leidinger et al 2017). Clicker training is a positive reinforcement animal training based on the use of a bridging stimulus (the clicker) in operant conditioning combined with a primary reinforcer (reward). Food is often used as reward. However, an alternative to food rewards is useful for studies such as diabetes and the microbiome. Rat tickling has been shown to improve animal welfare by mimicking aspects of playful rough play (Cloutier et al 2018, LaFollette et al 2018). Tickling produces > 50 kHz ultrasonic vocalisations (USV), which are associated with positive emotions, equivalent to human laughter (Brudzynski 2021)

Experimental Design and Methods


1st week
Arrival

2nd week
Acclimatization (5d)
Introduction of reward (3d)


3rd week
Introduction of reward with click (2d)
Daily training session (Ts) 1-5

4th week
Daily training session (Ts) 6-10


Experimental Setup



Tickling Reward



Food Reward (white chocolate cream)



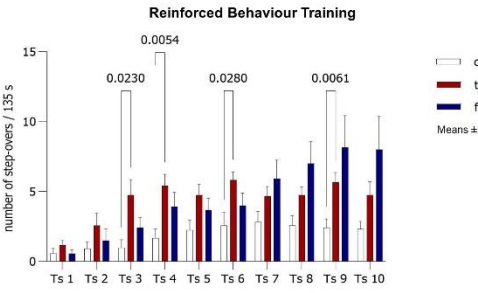
Groups: control (n=12), tickle (n=12), food (n=12). Control received no reward.
Measurements: voluntary step overs per training, sum of ultrasonic vocalisation (32-90 kHz) during training (USV), body weight
Analysis: Repeated measures two-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test of means

Aim

Can tickling be used in clicker training of female Lister Hooded rats as an effective alternative to food reward?

Results

Reinforced Behaviour Training



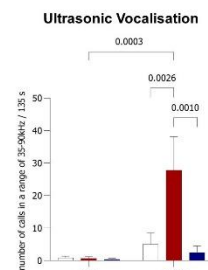
number of step-overs / 135 s

Legend: control (white), tickle (red), food (blue). Means ± SEM

Number of Reinforced Behaviour per Training:

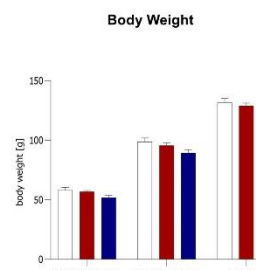
- The tickling group showed a significantly higher number of reinforced behaviours in four out of ten training sessions compared to the control group.
- No significant difference in the number of reinforced behaviours between the food rewarded group and the tickling group.

Ultrasonic Vocalisation



number of calls in a range of 35-90kHz / 135 s

Body Weight



body weight (g)

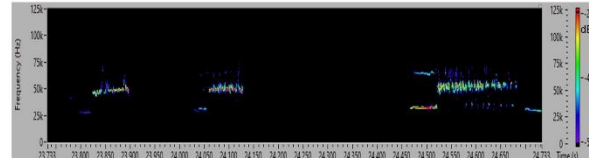
Ultrasonic Vocalisation:

- Significant increase of number of calls in the tickled group between first and last training.
- Significant differences in the sum of calls between the groups at "last training".

Body Weight:

- Age-appropriate weight development in all groups.
- No significant differences according to rewards or training.

Sonospectrogram of USV Trill Calls of a Ticked Rat during Training



Conclusion

- All groups gained weight according to their age. Neither the training nor the type of reward had a negative effect. The extra chocolate cream did not lead to obesity, nor did the animals lose weight due to stress or exhaustion caused by tickling.
- Positive conditions are indicated by a high number of UV calls, particularly trills, from tickled rats (Pankseep & Burgdorf 2010, Brudzynski 2021). This indicates that the tickling was accepted as a reward.
- The desired reinforced behaviour was safely learned by both trained groups already after the third and fourth training respectively.

With this data we showed that tickling can be used as an alternative to food reward in clicker training at least in female Lister Hooded rats.

References

Leidinger, C., Baumgart, J., Baumgart, N., Herrmann, F., Thöne-Reineke, Ch. 2017. Introducing clicker training as a cognitive enrichment for laboratory mice. *J. Vis. Exp.* (121), e55415
 Cloutier, S., LaFollette, M.R., Gaskill, B.N., Pankseep, J., Newberry, R.C. 2018. Tickling, a technique for inducing positive affect when handling rats. *J. Vis. Exp.* (135), e57190
 LaFollette M.R., O'Hairo M.E., Cloutier S., Gaskill B.N. (2018) A happier rat pack: The impacts of tickling pet store rats on human-animal interactions and rat welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 203: 92-102 <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.02.006>.
 Brudzynski SM (2021) Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. *Brain Sci.* 11/605, 1-44
 Pankseep, J., Burgdorf, J. 2010. Playful tickling arouses high-frequency ultrasonic chirping in young rodents. *American Journal of Play*, 357- 372




Abbildung 90: Posterpräsentation (2023) von der 60. Wissenschaftlichen Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) und der 21. Interessensgemeinschaft der Tierpfleger (IGTP).