

**Genetische und epigenetische Einflüsse auf die Entwicklung der  
Amygdala und des emotionalen Verhaltens – Untersuchungen an  
drei Mäusestämmen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Claudia Rose, geb. Wagner  
geb. am 16.02.1974 in Bamberg

Gutachter: Prof. Dr. Herbert Schwegler  
Prof. Dr. Katharina Braun  
Prof. Dr. Hans-Peter Lipp

Eingereicht am: 29. November 2005

Verteidigung am: 08. Juni 2006

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Thema:

**„Genetische und epigenetische Einflüsse auf die Entwicklung der Amygdala und des emotionalen Verhaltens – Untersuchungen an drei Mäusestämmen“**

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Hof, den 29.11.2005

Claudia Rose

## **Danksagung**

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Herbert Schwegler für die wissenschaftliche Leitung dieser Arbeit, sowie bei Frau PD Dr. Deniz Yilmazer-Hanke und Herrn Dr. Joachim Hanke für die Hilfe bei der Veröffentlichung der Ergebnisse. Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. Friedrich-Wilhelm Röhl vom Institut für Biometrie und Medizinische Informatik für die statistische Auswertung.

Auch danke ich Frau Ingetraut Zipreß und Frau Sibylle Röhl für die technische Assistenz sowie Frau Ursula Wiegand für die Literaturbeschaffung.

Ebenso hat die Leitung des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Fakultät, Herr Vet.-Ing. Christian Ochmann und Herr Vet.-med. Andreas Fenske, sowie die Tierpflegerinnen Corinna Runte und Nicole Schirm, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie für ihre freundliche Unterstützung, insbesondere Herrn Dipl.-Ing. Conrad Kurtz für die selbstgeschriebene Software für einige der Verhaltenstests und die kompetente Hilfe bei Computerproblemen.

Diese Arbeit wurde von Innomed e.V. als eine Qualifizierungsmaßnahme unter Nutzung von Mitteln des Sozialfonds (ESF) und des Landes Sachsen-Anhalt finanziert. Dort möchte ich Frau Dipl.-Ing. Gabriele Damm und Frau Dipl.-Biotechnologin Jutta Brada für ihre Unterstützung danken.

## **Zusammenfassung**

In der vorliegenden Dissertation wurden reziproke Embryotransfers zwischen den beiden Mäuseinzuchtstämmen C3H/HeN und DBA/2J und dem Auszuchtstamm NMRI durchgeführt, um genetische und maternale Effekte auf das Verhalten des adulten Nachwuchses in drei Tests von Angstverhalten (Motilitätsbox, Elevated Plus-Maze und Sensitivierung der akustischen Schreckreaktion) zu untersuchen. Hierbei ist erstmals der Transfer von Embryonen in Leihmütter des Stammes DBA/2J gelungen. Die Prozedur des Embryotransfers an sich hatte fast keine Effekte auf das Verhalten der beiden Inzuchtstämme, jedoch weitreichende Einflüsse auf Verhaltensparameter von NMRI-Mäusen, wo unter anderem ein Anstieg im Angstverhalten der Nachkommen beobachtet wurde. Stabile genetische Einflüsse wurden auf die horizontale und vertikale Aktivität sowie die Schreckhaftigkeit der Nachkommen gefunden. Im Gegensatz dazu waren genetischen Einflüsse auf das Angstverhalten variabel und stammesabhängig. Maternale Effekte auf das Verhalten des Nachwuchses der beiden Inzuchtstämme wurden beim Aufrichtverhalten in der Motilitätsbox und der Amplitude der akustischen Schreckreaktion gefunden. Im Gegensatz dazu zeigte der Auszuchtstamm NMRI eine Vielzahl von maternalen Effekten in allen Verhaltenstests. Um die globalen maternalen Effekte in uterine und postnatale Komponenten zu unterteilen, wurde eine zusätzliche Adoption beim Stamm NMRI durchgeführt. Einflüsse der uterinen Umwelt wurden in allen drei Tests gefunden und sie veränderten das Verhalten des Nachwuchses in Richtung des Rezipientenstammes. Postnatale Effekte wurden nur in der Motilitätsbox und der akustischen Schreckreaktion ermittelt und diese veränderten das Verhalten des Nachwuchses, mit einer Ausnahme, entgegengesetzt zum Verhalten des Leihmutterstammes. Beim nachfolgenden Vergleich der Neuropeptid Y (NPY)- und Parvalbumin (PARV)-exprimierenden Neurone in den Amygdalakerengebieten der Stämme C3H und DBA wurde bei unbehandelten DBA-Tieren eine signifikant höhere Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone im lateralen, basomedialen und zentralen Kern der Amygdala festgestellt. Auch bei den morphologischen Untersuchungen wurden weitreichende Effekte der Prozedur des Embryotransfers an sich festgestellt, welche wiederum stammesabhängig waren. Die Anzahl der NPY- und PARV-immunpositiven Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen der Nachkommen wurde vorwiegend von genetischen Faktoren determiniert. Maternale Effekte wurden nur auf die Anzahl NPY-exprimierender Neurone gefunden. Diese waren abhängig von der genetischen Herkunft der Blastozysten und veränderten die Zellzahl in Richtung des Rezipientenstammes. Zusammenfassend muss also festgestellt werden, dass der Embryotransfer das Verhalten und die Amygdalamorphologie der Nachkommen verändern kann.

# Inhaltsverzeichnis

## A. Einleitung

1. Die Amygdala	1
2. Intrinsische und extrinsische Projektionen der Amygdala	3
3. Synaptische Plastizität	6
4. Emotionales Gedächtnis	7
5. Untersuchung von Angstverhalten	8
5.1 Motilitätsbox	8
5.2 Elevated Plus-Maze	9
5.3 Sensitivierung der akustischen Schreckreaktion	10
6. Peptidexpression in der Amygdala	11
6.1 Neuropeptid Y (NPY)	11
6.2 $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)	12
7. Maternale Faktoren	13
8. Untersuchung maternaler Faktoren	14
9. Fragestellung	15

## B. Durchführung

1. Versuchstiere	17
1.1 Verwendete Mäusestämme	17
1.2 Versuchstierhaltung	18
2. Embryotransfer	19
2.1 Vasektomie	19
2.2 Medien für die Embryokultur	20
2.2.1. Herstellung der Stocklösungen	20
2.2.2 Sterilfiltration	21
2.2.3 Herstellung der Medien aus konzentrierten Stocklösungen	21
2.2.4 Einstellung des pH-Wertes	22
2.2.5 Bestimmung der Osmolarität	22

2.3	Blastozystengewinnung aus Spendertieren	22
2.4	Herstellung pseudoschwangerer Empfängertiere	24
2.5	Blastozystentransfer	25
2.6	Jungenaustausch	26
3.	Verhaltensuntersuchungen	26
3.1	Motilitätsbox	26
3.2	Elevated Plus-Maze	28
3.3	Sensitivierung der akustischen Schreckreaktion	29
4.	Perfusion und Gehirnentnahme	30
5.	Immunhistochemie	31
5.1	Neuropeptid Y (NPY)-Färbung	31
5.2	Parvalbumin (Parv)-Färbung	32
6.	Quantifizierung der Neurone	32
7.	Statistische Auswertung	33

## C. Ergebnisse

I.	Stammesunterschiede beim Erfolg der Embryotransfers	34
1.	Schwangerschaftsraten	34
2.	Überlebensraten der transferierten Blastozysten	35
2.1	Überlebensraten der gesamten transferierten Blastozysten bis zur Geburt	35
2.2	Überlebensraten der gesamten transferierten Blastozysten bis zum Absetzen	35
2.3	Überlebensraten der Blastozysten bis zur Geburt in erfolgreichen Schwangerschaften	36
2.4	Überlebensraten der Blastozysten bis zum Absetzen in erfolgreichen Schwangerschaften	37
3.	Durchschnittliche Wurfgröße bei erfolgreichen Schwangerschaften	37
II.	Verhaltensuntersuchungen	38
1.	Vergleich der drei Ausgangsstämme	38
2.	Effekt der Transferprozedur	41
3.	Vergleich der isogenen Transfers der drei Stämme	43
4.	Wechselseitiger Transfer der drei Ausgangsstämme	46
4.1	Drei-faktorielle Varianzanalyse	46

4.2 Ergebnisse der einzelnen Transfergruppen	49
4.2.1 Bestimmung von genetischen Einflüssen	50
4.2.1.1 Transfer von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in C3H-Rezipienten	50
4.2.1.2 Transfer von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in DBA-Rezipienten	54
4.2.1.3 Transfer von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in NMRI-Rezipienten	58
4.2.2 Bestimmung von maternalen Einflüssen	62
4.2.2.1 Transfer von C3H-Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme	62
4.2.2.2 Transfer von DBA-Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme	64
4.2.2.3 Transfer von NMRI-Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme	65
4.3 Zusammenfassung der Einzelmerkmale mittels Score-Analyse	68
4.4 Interpretation der Ergebnisse mit Hilfe der Summenscores	69
5. Abschätzung des Einflusses uteriner und postnataler Faktoren	73
5.1 Uterine Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen	73
5.2 Postnatale Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen	75
III. Immunhistochemische Untersuchungen	77
1. Neuropeptid Y (NPY)	77
1.1 Vorkommen NPY-immunpositiver Neurone in der Amygdala	77
1.2 Vergleich der Stämme C3H und DBA	77
1.3 Effekt der Transferprozedur	79
1.4 Vergleich der isogenen Transfers der beiden Stämme	81
1.5 Wechselseitiger Transfer der Stämme C3H und DBA	82
1.5.1 Drei-faktorielle Varianzanalyse	82
1.5.2 Einzelergebnisse der wechselseitigen Transfers	84
1.5.2.1 Bestimmung von genetischen Einflüssen	84
1.5.2.2 Bestimmung von maternalen Einflüssen	86
2. Parvalbumin (PARV)	88
2.1 Vorkommen PARV-immunpositiver Neurone in der Amygdala	88
2.2 Vergleich der Stämme C3H und DBA	88
2.3 Effekt der Transferprozedur	91

2.4 Vergleich der isogenen Transfers der beiden Stämme	91
2.5 Wechselseitiger Transfer der Stämme C3H und DBA	92
2.5.1 Drei-faktorielle Varianzanalyse	92
2.5.2 Einzelergebnisse der wechselseitigen Transfers	94
2.5.2.1 Bestimmung von genetischen Einflüssen	94
2.5.2.2 Bestimmung von maternalen Einflüssen	96
D. Diskussion	98
1. Erfolg der Embryotransfers	99
2. Verhaltensuntersuchungen	102
2.1 Effekt der Transferprozedur	103
2.2 Genetische und maternale Einflüsse auf das Verhalten	106
2.2.1 Genetische Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen	106
2.2.2 Maternale Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen	108
2.3 Uterine und postnatale Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen	109
2.3.1 Uterine Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen	109
2.3.2 Postnatale Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen	110
2.4 Weitere mögliche Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen	114
2.5 Zusammenfassung Verhaltensuntersuchungen	114
3. Immunhistochemische Untersuchungen	115
3.1 Neuropeptid Y (NPY)	115
3.2 Parvalbumin (PARV)	118
3.3 Zusammenfassung immunhistochemische Untersuchungen	120
4. Generelle Schlussfolgerung	121
E. Literaturverzeichnis	122
F. Anhang	
1. Abkürzungen	139
2. Tabellen	141

## A. Einleitung

### 1. Die Amygdala

Die Amygdala (auch Corpus amygdaloideum oder Mandelkern genannt) ist ein Kerngebiet im medialen Temporallappen, welches zum limbischen System gerechnet wird. Sie ist unter anderem involviert in eine Vielzahl von emotionalen Funktionen, wobei das Angst- bzw. Furchtverhalten unter den Säugetieren vermutlich am besten konserviert ist (Reviews: LeDoux, 2003; Misslin, 2003; Davis, 2000).

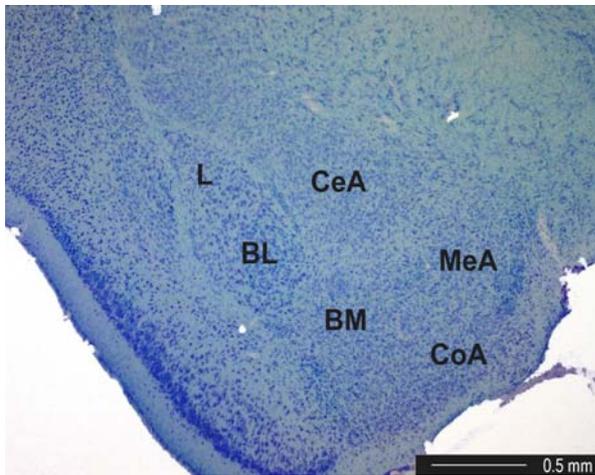


Abb.1. Amygdala der Maus.

Dargestellt ist ein Nissl-gefärbter Querschnitt durch den temporalen Pol eines Mausgehirns.

- L = lateraler Nucleus
- BL = basolateraler Nucleus
- BM = basomedialer Nucleus
- CeA = zentraler Nucleus
- MeA = medialer Nucleus
- CoA = kortikale Nuclei

Die Gehirnstruktur besteht aus anatomisch und funktionell unterschiedlichen Nuclei. Die 1819 vom Anatomen Burdach entdeckte basolaterale Amygdala (BLA) beinhaltet den lateralen (L), basolateralen (BL) und basomedialen (BM) Kern. Zusätzlich werden der zentrale (CeA), der mediale (MeA) und die kortikalen Nuclei (CoA) zum Amygdala-Komplex gerechnet (Sah et al., 2003; Pitkänen, 2000; Swanson und Petrovich, 1998) (Abb.1).

Die Amygdala ist weder strukturell noch funktionell eine Einheit (Swanson, 2003; Swanson und Petrovich, 1998). Die kortikalen Nuclei haben starke olfaktorische Bezüge und ähneln benachbarten olfaktorischen kortikalen Strukturen (Davis und Whalen, 2001). Der zentrale und mediale Kern der Amygdala sind ähnlich dem Striatum, benutzen GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) als inhibitorischen Neurotransmitter und enthalten eine Vielzahl von Neuropeptiden, wohingegen Neurone des lateralen und basolateralen Kerns der Amygdala viele gemeinsame Eigenschaften mit kortikalen Neuronen haben und Glutamat als exzitatorischen Neurotransmitter benutzen (Swanson und Petrovich, 1998; McDonald, 1996; Davis et al.,

1994).

Funktionell können die verschiedenen Nuclei der Amygdala in unterschiedliche Subsysteme unterteilt werden (Maren und Fanselow, 1996; LeDoux, 1995). Der basolaterale Komplex bildet die primäre sensorische Zwischenstation der Amygdala, wo Afferenzen von subkortikalen und kortikalen sensorischen Regionen konvergieren (Mc Donald, 1998; Pitkänen et al., 1997). Ein zweites Subsystem beinhaltet den zentralen Nucleus, welcher eine wichtige Zwischenstation zur Expression von emotionalem Verhalten darstellt, da er zu Zielgebieten im Hypothalamus und Hirnstamm projiziert, welche direkt in die Erzeugung von Furchtantworten involviert sind (Rogan und LeDoux, 1996). Der laterale Nucleus ist über den basolateralen und basomedialen Nucleus mit dem zentralen Nucleus verbunden (Pitkänen, 2000; Savander et al., 1997).

Die beiden bedeutendsten extrinsischen Fasersysteme der Amygdala sind der ventrale amygdalofugale Trakt und die Stria terminalis. Die Amygdala innerviert den Bettkern der Stria terminalis (BNST) und dazwischenliegende Regionen der Substantia innominata und diese teilen mit der Amygdala ähnliche Muster von absteigenden Projektionen, sodass diese Regionen als „erweiterte“ Amygdala zusammengefasst werden (Alheid, 2003; Cassell et al., 1999; de Olmos und Heimer, 1999).

Eine elektrische Stimulation der Amygdala ruft Verhaltensmuster hervor, welche jenen ähneln, die durch Stress oder furchtvolle Stimuli produziert werden (Chapman et al., 1954; Feindel und Penfield, 1954), wohingegen Läsionen der Amygdala den Erwerb und/oder die Expression von vielen Aspekten der Furchtantwort blockieren (File et al., 1998; Goldstein et al., 1996; Davis et al., 1993).

Beim Menschen wurden Amygdaläsionen assoziiert mit einer Verminderung des Gedächtnisses für Gesichter und Defiziten in der Erkennung von Emotionen auf Gesichtern (Adolphs et al., 1999; Broks et al., 1998; Calder et al., 1996). Weiterhin gehen Furcht und Angst oft epileptischen Anfällen der Temporallappen voraus, welche gewöhnlich einhergehen mit abnormaler elektrischer Aktivität der Amygdala (Gloor, 1992). Beim Affen führen bilaterale Resektionen des Temporallappens zum Klüver-Bucy-Syndrom, welches charakterisiert ist durch Furchtverlust, Hypersexualität, Hyperoralität, Veränderungen im Sozialverhalten und im maternalen Verhalten bei Weibchen (Klüver und Bucy, 1937,1934).

## **2. Intrinsische und extrinsische Projektionen der Amygdala**

Wichtige neuronale Schaltkreise der Amygdala wurden vor allem mittels der Untersuchung der akustischen Schreckreaktion bzw. der Furchtkonditionierung aufgeklärt (Reviews: Maren, 2001; LeDoux, 2000; Davis, 2000; Fendt und Fanselow, 1999). Bei dieser ubiquitären Form des Lernens erfolgt die Paarung eines emotional neutralen konditionierten Stimulus (CS), für gewöhnlich ein akustischer oder visueller Reiz, mit einem aversiven unkontingierten Stimulus (US), meist einem elektrischen Fußschock. Nach einer kurzen Anzahl von Paarungen produziert der neutrale Stimulus Effekte, die vorher nur durch den aversiven Stimulus hervorgerufen wurden, unter anderem Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck, somatomotorische Immobilität, Hypoalgesie und Potenzierung von somatischen Reflexen (Rogan und Le Doux, 1996; Fanselow, 1994). Ein Amygdalashaden interferiert mit dem Erwerb und der Expression von konditionierter Furcht (Maren und Fanselow, 1996; Bechara et al., 1995; LaBar et al., 1995).

Informationen über akustische Reize gelangen von den kochleären Rezeptoren durch den Hirnstamm zur auditorischen Thalamusregion. Diese leitet die Information durch eine direkte monosynaptische Verbindung zur Amygdala weiter (Doron und LeDoux, 1999), wie auch durch einen indirekten Weg über kortikale Strukturen (Romanski und LeDoux, 1992). Kortikale Projektionen zur Amygdala entstehen nicht im primären auditorischen Kortex, sondern in sekundären Feldern (auditorischer Assoziationskortex), welche sowohl direkte thalamische Projektionen wie auch Projektionen vom primären auditorischen Kortex erhalten (Romanski und LeDoux, 1993). Beide Wege konvergieren im lateralen Nucleus der Amygdala (Li et al., 1996; Romanski et al., 1993), welches das sensorisch rezeptive Gebiet der Amygdala ist. Obwohl der tonotopisch organisierte kortikale Input detailliertere Informationen über die exakte Natur des Stimulus liefert und daher für komplexe akustische Ereignisse notwendig ist, erlaubt der thalamoamygdaläre Pathway die schnelle Initiation von Verteidigungsmechanismen auf potentiell gefährliche Stimuli, welche dadurch nicht ins Bewusstsein gelangen (Le Doux, 1998; LeDoux et al., 1989).

Die Information über die Fußschocks wird ebenfalls über parallele thalamoamygdaläre und kortikoamygdaläre Projektionen weitergeleitet (Shi und Davis, 1999). Die Übertragung zur Amygdala erfolgt entweder über die posterioren intralaminaren Nuclei des Thalamus, welche die Information direkt vom Rückenmark erhalten (Cliffer et al., 1991; Dado und Giesler, 1990; LeDoux et al., 1987), oder über den parietalen insularen Kortex. Letzterer erhält konvergierende Informationen von somatosensorischen Kortizes, ventroposterioren und posterioren thalamischen Nuclei, posterioren intralaminaren Nuclei und dem

parabrachialen Nucleus des Mittelhirns (Shi und Cassell, 1998a,b; Craig et al., 1994; Yasui et al., 1989). Der parietale insulare Kortex und die posterioren intralaminaren thalamischen Nuclei projizieren wiederum zum lateralen, basolateralen, basomedialen und zentralen Nucleus der Amygdala (Shi und Cassell, 1998a,b; Shi und Davis, 1997). Im Gegensatz dazu enden visuelle und auditorische Informationen nur am lateralen Nucleus, welcher deshalb wichtig für die Plastizität ist (Shi und Cassell, 1997; McDonald und Mascagni, 1996; Romanski et al., 1993).

Vom lateralen Nucleus entspringen vier Hauptprojektionen. Zum einen existieren reziproke Projektionen zurück zum Kortex, einschließlich dem frontalen Kortex, welche für eine bewusste Empfindung von Furcht und Angst sowie Motivation und Auswahlverhalten verantwortlich sein könnten (Davis und Whalen, 2001). Des Weiteren gibt es unidirektionelle Projektionen zum ventralen Striatum und zum Nucleus accumbens, welche für die Motivation signifikante Informationen zu motorischen Gebieten weiterleiten, die notwendig für die Vermeidung von aversiven Stimuli sind. Letztendlich ist der laterale Nucleus auch direkt und über den basolateralen und basomedialen Nucleus mit dem zentralen Nucleus der Amygdala verbunden (Pitkänen et al., 1997, 1995; Savander et al., 1997). Dieser hat weit gestreute Verbindungen zu autonomen, neuroendokrinen und motorischen Strukturen in Hypothalamus und Hirnstamm (Davis, 2000) (Tab.1).

<b>Anatomische Zielstruktur</b>	<b>Anzeichen von Furcht oder Angst</b>
Zentrales Grau	Freezing, Hypoalgesie
Nucleus dorsalis nervi vagi Nucleus ambiguus	Kardiovaskuläre und gastrointestinale Effekte
Lateraler Hypothalamus	Tachykardie, Galvanische Hautreaktion, Erhöhung des Blutdrucks, Pupillendilatation
Ventrale tegmentale Area Locus coeruleus Lateraler dorsaler tegmentaler Nucleus Basales Vorderhirn	Erregung Erhöhte Wachsamkeit Erhöhte Aufmerksamkeit
Nucleus parabrachialis	Respiratorische Stressantwort
Nucleus reticularis pontis caudalis	Potenzierung von Schreckreaktionen
Nucleus facialis	Faziale Expressionen von Furcht und Angst
Nucleus paraventralis des Hypothalamus (meist über den Bettkern der Stria terminalis)	Kortikosteroid-Freisetzung

Tab.1. Projektionen des zentralen Kerns der Amygdala zu verschiedenen Zielstrukturen und mögliche Funktionen dieser Verbindungen in Bezug auf spezifische Anzeichen von Furcht und Angst (nach Davis und Whalen, 2001; Davis, 1997; Davis et al., 1994)

Läsionen des CeA interferieren mit der Expression von konditionierten Furchtantworten (Young und Leaton, 1996; Roozendaal et al., 1991; Hitchcock und Davis, 1986), wohingegen sich eine Zerstörung der anatomischen Zielgebiete des CeA selektiv auf die Expression von einzelnen Antworten auswirkt (Amarapanth et al., 1999; LeDoux et al., 1988).

Länger andauernde Effekte, die mehr Angst als Furcht ähneln und nicht abhängig von Konditionierung sind, könnten Projektionen zum lateralen Bettkern der Stria terminalis (BNST) involvieren (Walker et al., 2003; Davis und Shi, 1999; Davis, 1998).

Die kontextuelle Furchtkonditionierung (Furchtreaktion auf die Kammer, in welcher die CS-US-Paarung stattfindet) involviert neben der Amygdala auch den Hippokampus (Rudy et al., 2004; Antoniatidis und Mc Donald, 2000; Maren et al., 1997). Hierbei projizieren Gebiete des ventralen Hippokampus (CA1 und Subiculum) zum basolateralen und basomedialen Nucleus der Amygdala (Fanselow, 2000; Maren, 1999; Majidishad et al., 1996).

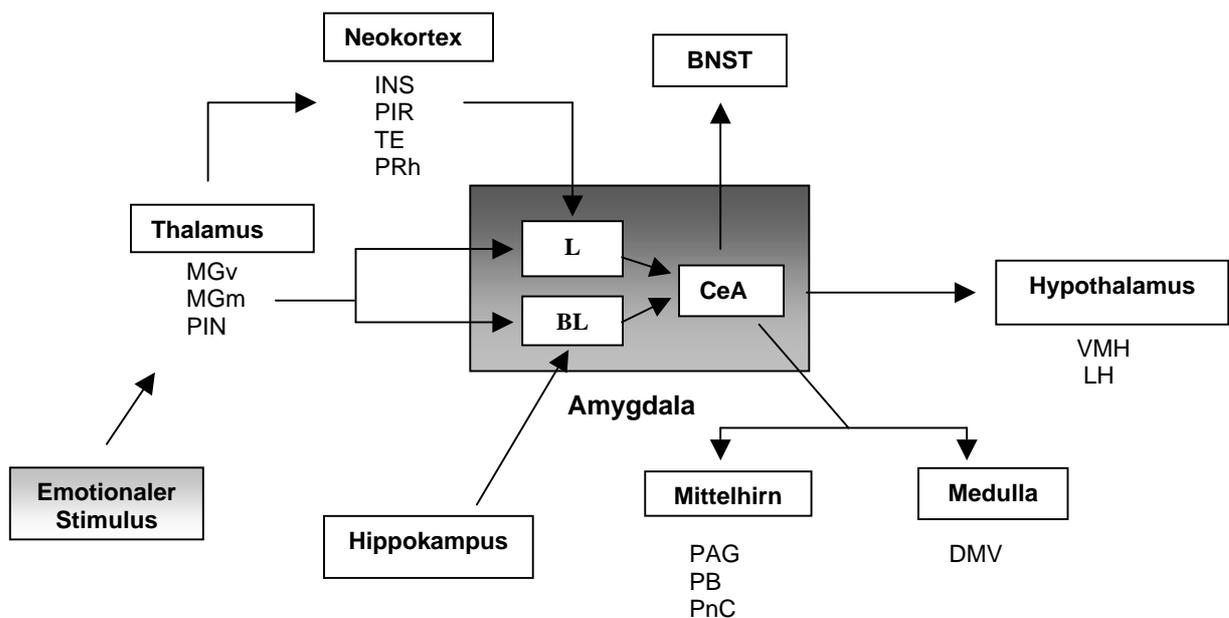


Abb.2. Extrinsische und intrinsische Projektionen der Amygdala.

CeA, zentraler Nucleus der Amygdala; BL, basolateraler Nucleus der Amygdala; BNST, Bettkern der Stria terminalis; DMV, Nucleus dorsalis nervi vagi; INS, Insula; L, lateraler Nucleus der Amygdala; LH, lateraler Hypothalamus; MGm und MGv, mediale und ventrale Anteile des medial geniculate Nucleus des Thalamus; PAG, zentrales Höhlengrau; PB, Nucleus parabrachialis; PIN, Nucleus intralaminaris posterior des Thalamus; PIR, piriformer Kortex; PnC, Nucleus reticularis pontis caudalis; PRh, perirhinaler Kortex; PVN, Nucleus paraventralis des Hypothalamus; TE, auditorischer Kortex; VMH, Nucleus ventromedialis hypothalami. Der Einfachheit halber wurden alle Projektionen als unidirektionelle Verbindungen dargestellt, obwohl diese in vielen Fällen reziprok sind.

### **3. Synaptische Plastizität**

Die Assoziation zwischen neutralen und aversiven Stimuli erfolgt in den lateralen/basolateralen Nuclei der Amygdala (Fanselow und LeDoux, 1999; Campeau und Davis, 1995) und Läsionen des BLA blockieren den Erwerb und die Expression von konditionierter Furcht (Cousens und Otto, 1998; Maren et al., 1996; Campeau und Davis, 1995). Die Furchtkonditionierung ist assoziiert mit einer Langzeit-Potenzierung (LTP; andauernde Form von synaptischer Plastizität) und einer erhöhten Synchronisation der Aktivität in den Projektionsneuronen des BLA (Maren, 2000; Paré und Collins, 2000; Rogan et al., 1997; Review: Maren und Quirk, 2004; Blair et al., 2001). Bei der Assoziation zwischen neutralem Stimulus und dem aversiven Ereignis sind NMDA (N-methyl-D-aspartat)-Rezeptor-vermittelte Prozesse in der Amygdala involviert (Walker und Davis, 2002; Gewirtz und Davis, 1997; Rogan und LeDoux, 1996). Die Infusion eines NMDA-Rezeptor-antagonisten (APV;  $\pm$ -2-Amino-5-phosphonovalonsäure) in die basolaterale Amygdala vor dem Training der Tiere verhindert die Induktion von LTP und auch die Furchtkonditionierung, jedoch wirkt sich eine APV-Infusion nur vor Testung der Tiere nicht auf die Expression von konditionierter Furcht aus (Paschall et al., 2001; Davis, 2000; Miserendino et al., 1990). Dies ist übereinstimmend mit der Rolle von NMDA-Rezeptoren bei der Induktion, nicht aber bei der Expression von LTP (Maren und Baudry, 1995; Bliss und Collingridge, 1993).

Im Gegensatz dazu blockieren AMPA ( $\pm$ - $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure)-Rezeptorantagonisten sowohl den Erwerb als auch die Expression von konditionierter Furcht (Walker und Davis, 2002; McKernan und Shinnick-Gallagher, 1997; Kim et al., 1993). Auch die präsynaptischen Gruppe II metabotropen Rezeptoren sind in die Furchtkonditionierung involviert (Walker und Davis, 2002; Stanek et al., 2000; Klodzinska et al., 1999; Helton et al., 1998).

Die transkriptionelle Aktivierung und die Proteinsynthese in der Amygdala sind essentiell für die Bildung des Furchtgedächtnisses (Goosens et al., 2000; Schafe et al., 2000, 1999; Schafe und LeDoux, 2000; Atkins et al., 1998) und es wurden einige Signaltransduktionsfaktoren und Mediatoren von strukturellen Organisationsprozessen identifiziert, welche im BLA der Maus während der Bildung des Furchtgedächtnisses induziert werden (Pape und Stork, 2003; Stork et al., 2001).

#### **4. Emotionales Gedächtnis**

Emotional beladene Ereignisse werden besser in Erinnerung behalten als neutrale Ereignisse, wobei die Amygdala verantwortlich ist für die Modulation des Gedächtnisses durch Emotionen (Cahill, 2000; Adolphs et al., 1997). Hierbei führt die Ausschüttung von adrenalen Stresshormonen (Noradrenalin und Glucokortikoide) während emotional erregenden Ereignissen zu einer Freisetzung von Noradrenalin und Acetylcholin im basolateralen Komplex der Amygdala (Reviews: Paré, 2003; McIntyre et al., 2003; McGaugh, 2002). Glucokortikoide können die Blut-Hirn-Schranke frei passieren und direkt Mineralokortikoid- und Glucokortikoid-Rezeptoren im Gehirn aktivieren (Honkaniemi et al., 1992). Im Gegensatz dazu kann Adrenalin nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Weil-Malherbe et al., 1959), jedoch befinden sich  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren auf dem aufsteigenden Nervus vagus (Schreurs et al., 1986). So könnte peripheres Adrenalin über Projektionen des Nervus vagus zu noradrenergen Neuronen des Nucleus tractus solitarii (NTS), und von dort aus über Projektionen zum Nucleus paragigantocellularis und weiter zum Locus coeruleus (LC), zu einer Noradrenalin-Freisetzung in der Amygdala führen (McGaugh, 2002; Clayton und Williams, 2000; Van Bockstaele et al., 1999). Die Aktivierung von muscarinischen Rezeptoren innerhalb der basolateralen Amygdala durch cholinerge Neurone vom Nucleus basalis magnocellularis ist eine Voraussetzung für die Noradrenalin-induzierte Gedächtnisverstärkung (Power und McGaugh, 2002; Dalmaz et al., 1993). Läsionen des basolateralen Komplexes, wie auch der Stria terminalis, blockieren die Gedächtnis-modulierenden Effekte von Stresshormonen (Roesler et al., 2002; Roozendaal et al., 1998, 1996; Roozendaal und McGaugh, 1996) und Injektionen von  $\beta$ -adrenergen oder muscarinischen Receptoragonisten in die Amygdala nach dem Lernereignis erhöhen die Retention (Ferry und McGaugh, 1999; Salinas et al., 1997).

Auch Einflüsse von anderen neuromodulatorischen Systemen, wie dem GABAergen System und dem peptidergen System, auf die Speicherung von Erinnerungen werden durch die Freisetzung von Noradrenalin in der Amygdala vermittelt (Ferry und McGaugh, 2000; Brioni et al., 1989; Gallagher et al., 1985).

Die Amygdala ist vermutlich nicht die Speicherstelle für emotional geförderte Erinnerungen (Parent et al., 1995), sondern fördert die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses in anderen Gehirnstrukturen, wo die Erinnerungen tatsächlich gespeichert werden, wie Hippokampus und Striatum (Paré, 2003; McIntyre et al., 2001; Packard und Teather, 1998). Eine Überaktivierung dieses modulatorischen Systems könnte zur Entwicklung des posttraumatischen Stress-Syndroms beitragen (Pitman, 1989).

## **5. Untersuchung von Angstverhalten**

Es existieren einige Verhaltenstests, um auf Angst basierendes Verhalten bei Nagern zu untersuchen (Reviews: Karl et al., 2003; Finn et al., 2003; Carola et al., 2002; Belzung und Griebel, 2001; File, 2001).

### **5.1 Motilitätsbox**

Die Motilitätsbox ist eigentlich ein verkleinertes Open Field, welches horizontale und vertikale Aktivität misst. Einige der gemessenen Verhaltensmerkmale schließen emotionale Faktoren ein (Rodgers, 1997; Archer, 1973). Die Tiere werden in eine umrandete Box gesetzt, die sie für einen gewissen Zeitraum frei erkunden können. Die neue Umwelt erzeugt beim Tier einen Konflikt zwischen Angst und Erkundungsverhalten (Montgomery, 1955) und die Nager tendieren dazu, offene Plätze zu meiden und konzentrieren ihre Lokomotion auf das periphere Gebiet, wo sie die Wände berühren können (thigmotaktisches Verhalten). Offene Flächen, also das Zentrum der Box, würden in freier Wildbahn eine Gefahr darstellen und haben anxiogene Wirkung (Ramos und Mormède, 1998; Archer, 1973; Hall, 1934), ebenso wären Aufrichtungen des Tieres in freier Wildbahn gefährlich. Die verschiedenen Verhaltensweisen wie horizontale Exploration, die Frequenz von Aufrichtungen and Anlehnungen an die Wände sowie die im Zentrum der Box verbrachte Zeit werden quantifiziert.

Die Motilitätsbox ist kleiner als das Open Field, und deshalb sind die emotionalen Faktoren, welche die lokomotorische Aktivität beeinflussen, vermutlich reduziert (Markel et al., 1989; Goma and Tobena, 1978). Der Vorteil dieses Systems ist jedoch die präzise Quantifizierung der horizontalen und vertikalen Aktivität, sodass diese Parameter untereinander in Bezug gesetzt werden können (Yilmazer-Hanke et al., 2004b).

Klassische anxiolytische Substanzen, wie Benzodiazepine und 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonisten, erhöhen die Lokomotion im Zentrum des Open Field, während anxiogene Substanzen, wie CRF (Corticotropin Releasing Factor)-Rezeptorantagonisten, diese vermindern (Prut und Belzung, 2003; Bert et al., 2001; Schmitt et al., 2000).

## 5.2 Elevated Plus-Maze

Das Elevated Plus-Maze (EPM) ist das meistbenutzte Modell für Angstverhalten bei Nagern (Korte und De Boer, 2003; Lister, 1987). Das Maze besteht aus vier erhöhten Armen, welche in einem Kreuz angeordnet sind. Zwei der gegenüberliegenden Arme besitzen hohe Seitenwände und werden daher als geschlossene Arme bezeichnet, während die anderen beiden Arme keine Wände haben und daher als offene Arme bezeichnet werden. In der Mitte befindet sich eine zentrale Plattform, von der aus das Tier in jeden der vier Arme gelangen kann. Die gesamte Apparatur befindet sich etwa 1 Meter über dem Boden, sodass die Mäuse von den offenen Armen herunterfallen können. Die Tiere werden in die zentrale Plattform gesetzt und können das Maze für eine gewisse Zeit frei erkunden. Der Verhaltenstest basiert auf einem Konflikt zwischen Explorationsverhalten und Furcht vor offenen und exponierten Gebieten. Nager zeigen höheres Vermeidungsverhalten und geringere Exploration in den offenen Armen des Maze als in den geschlossenen Armen (Pellow und File, 1986; Pellow et al., 1985; Montgomery, 1955), was vermutlich auf der Abwesenheit von thigmotaktischen Signalen auf diesen Kompartimenten beruht (Rodgers und Dalvi, 1997; Treit et al., 1993).

Die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Kompartimente des Maze oder in die geschlossenen Arme wird als Indikator der generellen Aktivität benutzt (File, 2001; Rodgers und Johnson, 1995), während der Prozentsatz von Eintritten in die offenen Arme und die darin verbrachte Zeit als Indikator des Angstverhaltens angesehen wird (Ramos und Mormède, 1998; Pellow et al., 1985). Der Aufenthalt auf der zentralen Plattform des Maze wird als Entscheidungsfindungsprozess oder als ein Ausdruck der „Risikoabschätzung“ betrachtet (Rogers und Johnson, 1995; Cruz et al., 1994; Rodgers et al., 1992).

Vor allem Reagenzien, welche am GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepin-Rezeptorkomplex agieren (Ethanol, Benzodiazepine, Barbiturate, etc.), produzieren konsistente und reproduzierbare Effekte auf das Angstverhalten der Tiere im EPM (Hogg, 1996; Rodgers et al., 1995; Handley und McBlane, 1993). Aber auch die Effekte vieler anderer, das Angstverhalten modulierender Agenzien können mit diesem Test festgestellt werden, jedoch sind die Befunde dort etwas mehr variabel (Dawson und Tricklebank, 1995; Handley and McBlane, 1993).

### 5.3 Sensitivierung der akustischen Schreckreaktion

Die akustische Schreckreaktion (ASR) ist ein unfreiwilliges schnelles Zusammenzucken von somatischen Muskeln aufgrund eines plötzlichen unangenehmen sensorischen Stimulus, welches in allen Säugerspezies gefunden wird (Koch, 1999; Koch und Schnitzler, 1997; Yeomans und Frankland, 1996). Der Reflex wird durch einen relativ einfachen oligosynaptischen Kreislauf vermittelt, welcher im niederen Hirnstamm lokalisiert ist und eine sehr kurze Latenzzeit besitzt (Caeser et al., 1989). Er beinhaltet nur drei Synapsen an kochleären Wurzelneuronen, Neuronen im Nucleus reticularis pontis caudalis (PnC) und an den Motorneuronen der Hirnnervenkerne und des Rückenmarks (Walker und Davis, 2002; Lee et al., 1996; Lingenhöhl und Friauf, 1994). Die kochleären Neurone (interstitielle Neurone der VIII Nervenwurzel) erhalten direkte Informationen von den Ganglienzellen in der Kochlea und projizieren zum PnC der retikulären Formation, welchem eine Schlüsselrolle in diesem Reflex zukommt (Carlson und Willot, 1998). Die Riesenneuronen im ventrokaudalen Teil des PnC aktivieren schließlich Motorneurone in Hirnstamm und Rückenmark (Yeomans und Frankland, 1996; Lingenhöhl und Friauf, 1994).

Die Neurone des PnC erhalten auch Projektionen von anderen Nuclei des zentralen auditorischen Pathways, einschließlich dem dorsalen und ventralen kochleären Nucleus und der lateralen oberen Olive, wie auch Projektionen von anderen Nuclei der Formatio reticularis, einschließlich des ventrolateralen tegmentalen Nucleus (Meloni und Davis, 1998; Herbert et al., 1997; Lee et al., 1996; Kandler und Herbert, 1991), jedoch liefert die direkte Projektion von den kochleären Wurzelneuronen zum PnC die kürzeste Latenzzeit (Koch, 1999).

Die Schreckreaktion kann verstärkt werden durch konditionierte Furcht und sensitiviert werden durch Fußschocks (Dirks et al., 2001; Koch, 1999; Davis et al., 1997; Davis, 1989). Die Amygdala ist sowohl wichtig für die Sensitivierung dieses Reflexes durch Fußschocks (Fendt et al., 1994b; Sananes und Davis, 1992) als auch für die Furchtkonditionierung (Davis et al., 1993; Sananes und Davis, 1992). Es besteht eine direkte Projektion vom medialen Teil des CeA über den ventralen amygdalofugalen Trakt zum PnC (Koch und Ebert, 1993, Rosen et al., 1991), jedoch existieren auch indirekte Projektionen über das zentrale Höhlengrau (Fendt et al., 1996, 1994a), den laterodorsalen tegmentalen Nucleus (Hitchcock und Davis, 1991) und die tiefen Kerne des Mittelhirns (Frankland und Yeomans, 1995). Sowohl Läsionen des CeA als auch des zentralen Graus blockieren die Sensitivierung der akustischen Schreckreaktion (Fendt et al., 1994a; Hitchcock et al., 1989).

## **6. Peptidexpression in der Amygdala**

In der Amygdala wird die meiste Neuropeptid-Expression im CeA und im MeA gefunden, die limitierte Peptid-Expression im basolateralen Komplex ist meist auf Interneurone beschränkt (Swanson und Petrovich, 1998; Davis et al., 1994). Es wurden einige Neuropeptide identifiziert, welche in das Angstverhalten involviert sind (Reviews: Holsboer, 2003; Landgraf, 2001; Griebel, 1999).

### **6.1 Neuropeptid Y (NPY)**

NPY ist eines der am weitesten verbreiteten Peptide im ZNS und wird vor allem von Neuronen im Hypothalamus, in limbischen Strukturen, im zerebralen Kortex, im Hirnstamm und im Striatum exprimiert (Gray und Morley, 1986). Das hochkonservierte Peptid besteht aus 36 Aminosäuren und ist in eine Vielzahl von Prozessen involviert, wie dem circadianen Rhythmus (Yannielli und Harrington, 2001), der Nahrungsaufnahme (Beck, 2000; Gerald et al., 1996), dem Gedächtnis (Redrobe et al., 1999; Flood et al., 1989), der sympathischen Kontrolle der kardiovaskulären Funktion (Klemfuss et al., 1998; Hokfelt et al., 1998), der neuronalen Erregbarkeit (Vezzani et al., 1999; Palmiter et al., 1998), den Verhaltensantworten auf Stress (Thorsell et al., 1999, 1998) und dem Angstverhalten (Heilig und Widerlov, 1995). Die Effekte von NPY werden durch mindestens 5 Klassen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  und  $Y_6$ ) vermittelt (Michel et al., 1998), wobei  $Y_1$ - und  $Y_5$ -Rezeptoren in die neurobiologischen Mechanismen von Emotionalität und Furcht involviert sind (Berglund et al., 2003; Kask et al., 2002; Sajdyk et al., 2002, 1999). Die Amygdala enthält hohe Level von NPY (de Quidt und Emson, 1986a,b; Allen et al., 1983), moderate Mengen von  $Y_1$ - und  $Y_2$ -Rezeptoren und geringe Level von  $Y_5$ -Rezeptoren (Wolak et al., 2003; Oberto et al., 2001).

NPY hat einen anxiolytischen Effekt in einer Vielzahl von Verhaltenstests. NPY-defiziente Mäuse zeigten erhöhtes Angstverhalten im Open Field (Bannon et al., 2000), weiterhin führte die intrazerebroventrikuläre Gabe eines selektiven  $Y_1$ -Rezeptorantagonisten zu einer gesteigerten Defäkation im Open Field (Kask und Harro, 2000). Auf dem EPM steigerte eine Gabe von NPY oder NPY-Agonisten die verbrachte Zeit in den offenen Armen (Heilig, 1995; Kirby et al., 1995; Broqua et al., 1995, 1994; Heilig et al., 1989), während die Gabe von  $Y_1$ -Rezeptorantagonisten zu anxiogenen Effekten führte (Kask et al., 1997, 1996). Auch inhibierten Injektionen von NPY die Furcht-potenzierte Schreckreaktion (Broqua et al., 1995; Wettstein et al., 1994) und Furchtkonditionierung erhöhte die NPY-Level in der Amygdala (Krysiak et al., 2000).

## 6.2 $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)

GABA ist einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS und wird durch zwei Isoformen der Glutamat-Decarboxylase (GAD65 und GAD67) synthetisiert (Erlander et al., 1991; Martin et al., 1991). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, welche vorwiegend die inhibitorischen Effekte vermitteln, sind pentamere Chlorid-Kanäle, welche aus Kombinationen von 18 bisher identifizierten Untereinheiten zusammengesetzt sind (Rudolph et al., 2001; Sieghart, 2000; Barnard et al., 1998). In der Amygdala existiert eine tonische GABAerge Inhibition im BLA (Shekhar et al., 2003; Sanders und Shekhar, 1995a) und eine lokale Infusion in GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten führt zu einem Anstieg in glutamaterger Erregung und einem nachfolgenden Anstieg in Herzfrequenz, Blutdruck und Angstverhalten (Sajdyk und Shekhar, 1997; Sanders und Shekhar, 1995a,b). Des Weiteren zeigen GAD65-defiziente Mäuse ein erhöhtes Angstverhalten im Open Field und auf dem EPM (Kash et al., 1999).

Benzodiazepine und ihre Agonisten produzieren ihre pharmakologischen Effekte durch Bindung an eine allosterische Benzodiazepin-Erkennungsstelle am GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkomplex, erhöhen die Aktivität dieses Rezeptors für seinen Neurotransmitter und fördern somit die inhibitorische Aktivität von GABA (Macdonald und Olsen, 1994; Zorumski und Isenberg, 1991; Tallman und Gallager, 1985). Viele Verhaltensversuche mit Nagern haben einen anxiolytischen Effekt von Benzodiazepin-Agonisten gezeigt (Schmitt et al., 2000; Jessa et al., 1996; Griebel et al., 1996a; Dalvi und Rodgers, 1996), umgekehrt haben inverse Benzodiazepin-Agonisten anxiogene Effekte (Clément et al., 1997; Prado de Carvalho et al., 1983). Die anxiolytischen Effekte von Benzodiazepinen im EPM werden nach lokaler Infusion in den lateralen und basolateralen Nucleus der Amygdala erhalten, welche die höchsten Dichten von Benzodiazepin-Rezeptoren in der Amygdala aufweisen (Niehoff und Kuhar, 1983), nicht jedoch nach lokaler Infusion in den CeA (Pesold und Treit, 1995; Green und Vale, 1992). Jedoch haben Benzodiazepine auch anxiolytische Effekte bei Tieren mit Amygdaläläsionen (Kopchia et al., 1992; Yadin et al., 1991).

In den Interneuronen des BLA sind GABA und NPY kolokalisiert (Eva et al., 2004; Oberto et al., 2001; McDonald und Pearson, 1989). Weiterhin existiert dort eine Kolokalisation von GABA mit den Calcium-bindenden Proteinen Parvalbumin, Calbindin-D<sub>28k</sub> und Calretinin (Pitkänen und Kempainen, 2002; Kempainen und Pitkänen, 2000), und Antikörper gegen diese Proteine können als neuroanatomische Marker verwendet werden (Baimbridge et al., 1992). Fast alle Parvalbumin-immunpositiven Neuronen in der BLA sind GABAerg und ihre Hauptfunktion besteht vermutlich in der Feedback-Inhibition innerhalb des BLA, da sie vorwiegend exzitatorischen Input von Projektionsneuronen des BLA erhalten und

symmetrische Synapsen mit Somata oder proximalen Dendriten von pyramidalen Zellen bilden (Mc Donald und Mascagni, 2001; Smith et al., 2000, 1998).

Des Weiteren sind die Peptide Corticotropin-Releasing Factor (CRF) (Bale und Vale, 2004; Van Gaalen et al., 2002), Neurotensin (NT) (Kitabgi, 2002; Griebel et al., 2001), Cholecystokinin (CCK) (Rotzinger und Vaccario, 2003; Herranz, 2003) und Substanz P (SP) (Santarelli et al., 2001; Teixeira et al., 1996) in die Modulation des Angstverhaltens involviert und produzieren anxiogene Effekte in einer Vielzahl von Verhaltenstests.

## **7. Maternale Faktoren**

Verschiedene Mäuseinzuchtstämme unterscheiden sich in ihrem Angstverhalten in der Motilitätsbox, auf dem EPM und in der Furcht-sensitiven ASR (Carola et al., 2002; Dirks et al., 2001; van Gaalen und Steckler, 2000; Griebel et al., 2000; Falls et al., 1997; Logue et al., 1997; Bullock et al., 1997; Carlson et al., 1996; Trullas und Skolnick, 1993). Als Ursache der Variation unter Stämmen werden oft direkte genetische Effekte angenommen und Mäuseinzuchtstämme werden aufgrund ihres gut charakterisierten Genoms für die Suche nach Genen verwendet, welche mit Verhaltensmerkmalen assoziiert sind. Eine Vielzahl von Genorten für das Angstverhalten wurde bisher schon durch QTL (Quantitative Trait Loci)-Analyse gefunden (Review: Flint, 2003).

Jedoch unterscheiden sich Mäusestämme nicht nur in ihrem Genotyp, sondern auch in ihrer maternalen Umwelt im frühen Leben (Clément et al., 2002). Zusätzlich zu den nucleären Genen liefern die Weibchen Mitochondrien, Ei-Cytoplasma und die für die Entwicklung notwendige Umwelt. So können maternale Effekte entweder genetisch (X-chromosomal, mitochondriale DNA, genomisches Imprinting) oder umweltbedingt (cytoplasmatische, uterine und postnatale Komponenten) sein (Carlier et al., 1992; Roubertoux et al., 1990). Diese können additiv oder in Interaktion miteinander und/oder mit dem Genotyp des Nachwuchses agieren. Maternale Effekte werden oft als epigenetische Faktoren klassifiziert, da sie die Genexpression des Nachwuchses modifizieren und deshalb potentiell die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp beim Nachwuchs verändern (Reviews: Robinson, 2004; Crabbe und Phillips, 2003).

Bei Säugern ist das uterine Leben relativ lang und beträgt bei Mäusen etwa 20 Tage. Die uterine Umwelt ist abhängig vom genetischen Hintergrund der Mutter und von den Umweltbedingungen, denen diese während der Schwangerschaft ausgesetzt ist. Uterine Einflüsse auf

den sich entwickelnden Fetus können vermittelt werden durch den Grad der Vaskularisierung der Plazenta, welcher die Übertragung von Sauerstoff, Nährstoffen oder Antikörpern kontrolliert, wie auch durch maternale Hormone, maternalen Metabolismus und uteriner Wurfgröße (Rossiter, 1996; Atchley et al., 1991). Uterine Einflüsse wurden bisher auf das adulte kognitive Verhalten (Denenberg et al., 2001, 1998, 1991), die sensorische und motorische Entwicklung (Roubertoux et al., 1990; Nosten und Roubertoux, 1988), den Salzappetit bei hypertensiven Ratten (Erkadius et al., 1996), den freiwilligen Ethanolkonsum (Randall und Lester, 1975) und das Gewicht (Brumby, 1960) der Nachkommen gefunden. Ein uteriner sowie ein cytoplasmatischer Effekt wurden auf das Alter der Nachkommen bei Öffnung der Augenlider gefunden (Nosten und Roubertoux, 1988). Diese Studie ist der einzige bisher gezeigte cytoplasmatische Effekt.

Der Nachwuchs von Mäusen ist bei der Geburt unreif und sein Überleben in den ersten drei Wochen hängt von der maternalen Fürsorge ab. Postnatale Effekte könnten durch unterschiedliches Brutpflegeverhalten der Mütter entstehen (Carlier et al., 1982) oder durch Unterschiede in der Produktion und Zusammensetzung der Milch (Ragueneau, 1987). Postnatale maternale Effekte wurden für den Blutdruck (Cierpial and McCarthy, 1991), die Reflex-Ontogenie (Ward, 1980), Lernen (Bovet-Nitti et al., 1968), Aggression (Southwick, 1968), Reaktivität auf eine neue Umwelt (Gomez-Serrano et al., 2001; Van Abeelen, 1980; Poley und Rayce, 1970; Bovet-Nitti et al., 1968; Reading, 1966) und die sensorische und motorische Entwicklung (Nosten, 1989) der Nachkommen gefunden.

## **8. Untersuchung maternaler Faktoren**

Es existieren verschiedene Möglichkeiten zur Untersuchung von maternalen Einflüssen auf das Verhalten. Ein globaler maternaler Effekt (prä- und/oder postnatale maternale Effekte) kann durch Vergleich von reziproken weiblichen F1-Hybriden zweier Inzuchtstämme gezeigt werden (Carlier et al., 1992).

Eine Abgrenzung der direkten genetischen Effekte von maternalen Einflüssen kann durch die Methode des Embryotransfers erfolgen (Carlier et al., 1992; Brumby, 1960). Es existieren verschiedene Transfertechniken, wobei bei operativen Transfers die Embryonen entweder in die Tube oder den Uterus der Rezipienten transferiert werden. Die Synchronisierung der embryonalen und endometrialen Entwicklung ist sehr wichtig für eine erfolgreiche Implantation der Embryonen (Fisher und Smithberg, 1973; Doyle et al., 1963; McLaren und Michie, 1956). Beim Ovidukttransfer können Embryonen vom 1-Zell- bis zum Morula-

Stadium (0,5 bis 2,5 Tage) in die Ampulle des Rezipienten am Tag 1 der Pseudoschwangerschaft transferiert werden, beim Uterustransfer werden 3,5 Tage alte Blastozysten in den Uterus eines pseudoschwangeren Rezipienten am Tag 2,5 transferiert.

Zum Nachweis eines cytoplasmatischen Effekts kann die Ovartransplantation herangezogen werden (DeFries et al., 1967), jedoch muss hierfür der Rezipient das Histokompatibilitäts-Allel des Donors besitzen. Die Transplantation kann daher nicht von einem Inzuchtstamm in einen anderen erfolgen, sondern es werden F1-Hybride als Rezipienten verwendet (Carlier et al., 1992).

Die Methode der Leihmutterschaft dient zur Abgrenzung der postnatalen maternalen Umwelt von allen anderen Effekten, die vor oder während der Geburt agieren, einschließlich der genetischen Effekte. Hierbei erfolgt der Transfer eines ganzen Wurfes von einem gegebenen Weibchen zu einem anderen.

## **9. Fragestellung**

Die Technik des Embryotransfers wird auch kommerziell für die Herstellung von transgenen Tieren (Osada und Maeda, 1998; Hofker und Breuer, 1998), die Sanierung von Tieren (Van Keuren und Saunders, 2004; Morrell, 1999) und die Embryo-Kryokonservierung (Rall et al., 2000; Glenister und Thornton, 2000) benötigt. Zur Sanierung von kontaminierten Stämmen wurden früher die Nachkommen oft per Kaiserschnitt zur Welt gebracht, jedoch können gewisse Viren die Plazenta-Barriere passieren und Embryonen in verschiedenen Stadien der Entwicklung infizieren (vertikale Transmission) (Morell, 1999). Da die Zona pellucida, welche den Embryo bis zur Implantation umgibt, den Kontakt zwischen infektiösen viralen Partikeln und der Zellmembran zu verhindern scheint (Reetz et al., 1988; Carthew et al., 1985), ist die Sanierung von Tieren mittels Embryotransfer möglich (Okamoto und Matsumoto, 1999; Reetz et al., 1988). Die Kryokonservierung dient zur Archivierung von Mäusestämmen. Für selten benötigte Stämme sind die Kosten der Kryokonservierung oft geringer als die Kosten einer kontinuierlichen Zucht (Mobraaten, 1986), des Weiteren bietet die Archivierung einen Schutz vor dem Verlust der Stämme durch ausbleibende Zucht oder genetischen Veränderungen.

In der vorliegenden Dissertation sollte geklärt werden, ob die Prozedur des Embryotransfers an sich oder der Stamm der verwendeten Leihmutter einen Einfluss auf das Verhalten der Nachkommen der transferierten Blastozysten haben. Dies wurde am Beispiel des Amygdala-vermittelten Angstverhaltens untersucht. Die Inzuchtmäusestämme DBA/2J und C3H/HeN

wurden verwendet, da sie sich in einer Vielzahl von Verhaltensuntersuchungen unterscheiden, z.B. in der Furcht-sensitivierten ASR, auf dem EPM, im Water Maze und im Radiallabyrinth (Yilmazer-Hanke et al., 2003; Schwegler et al., 1996). Da jedoch unklar war, ob der Embryotransfer in DBA-Leihmütter gelingen würde, wurde zusätzlich noch der Auszuchtstamm NMRI in die Analyse mit einbezogen. NMRI-Mäuse sind gute Embryorezipienten, da sie eine relativ geringe Aggressivität gegenüber Neugeborenen zeigen und sich durch eine gute Milchproduktion auszeichnen. Daher werden sie auch oft als Rezipienten für den kommerziellen Embryotransfer benutzt. Es wurden reziproke Embryotransfers zwischen den drei Stämmen durchgeführt und das Angstverhalten des resultierenden adulten Nachwuchses wurde in der Motilitätsbox, auf dem EPM und in der Furcht-sensitivierten ASR untersucht. Um die globalen maternalen Effekte in uterine und postnatale Faktoren zu unterteilen, wurde ein zusätzlicher Jungenaustausch beim Stamm NMRI durchgeführt. Weiterhin wurde die Anzahl der NPY- und Parvalbumin-immunpositiven Neuronen in den Amygdalakerengebieten der Stämme DBA und C3H quantifiziert, um einen möglichen Einfluss dieser Peptide auf Unterschiede im Angstverhalten der beiden Mäusestämme zu untersuchen.

## B. Durchführung

### 1. Versuchstiere

#### 1.1 Verwendete Mäusestämme

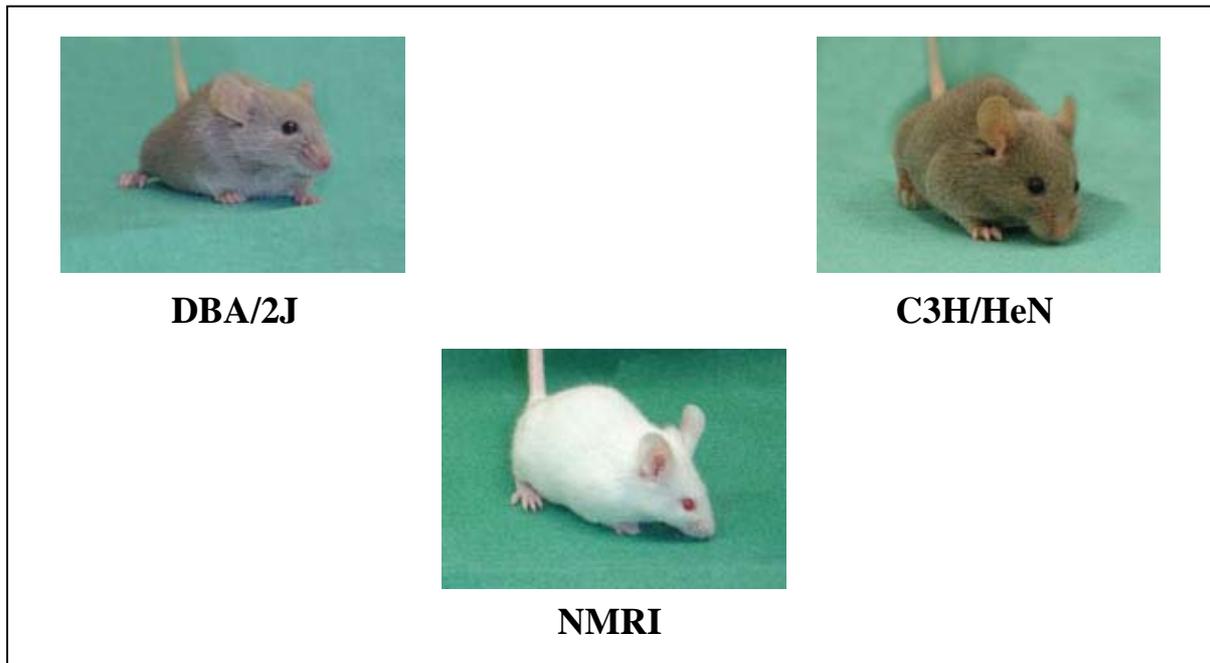


Abb.3. Verwendete Mäusestämme für den Embryotransfer

#### DBA/2J

Dieser Inzuchtstamm ist einer der ältesten Mausinzuchtstämmen. Die Inzucht wurde 1909 von Little begonnen, ausgehend von einer Maus-Kolonie, welche für die Fellfarbe segregierte. Von 1929 bis 1930 wurden Kreuzungen unter Substämmen durchgeführt und einige neue Substämme etabliert, einschließlich DBA/1 und DBA/2. Diese beiden Substämme unterscheiden sich in einer großen Anzahl von Loci (einschließlich des MHC H2-Haplotyps), was vermutlich auf restliche Heterozygotie bei der Trennung der Substämme zurückzuführen ist. Der Name des Stammes weist auf eine Mutation der Fellfarbe hin: d für dilute, b für braun und a für nicht-Aguti.

Der hier verwendete Stamm kam 1998 aus einem Stock des Instituts für Humangenetik, Universität Heidelberg und wird seitdem im Zentralen Tierlabor der Universität Magdeburg durch Bruder-Schwester-Verpaarung weiter gezüchtet.

### C3H/HeN

Der C3H-Elternstamm wurde 1920 von Strong entwickelt aus der Kreuzung eines Bagg albino-Weibchens mit einem DBA-Männchen und nachfolgender Selektion auf hohes Vorkommen von Brusttumoren. Das hohe Vorkommen von Brusttumoren resultierte aus einem exogenen Virus (MMTV = Mouse Mammary Tumor Virus), welcher durch die Muttermilch übertragen wurde.

Der Substamm C3H/He wurde 1941 nach Heston gebracht und von dort aus weit verbreitet. Der Substamm C3H/HeN ist nun frei von exogenem MMTV.

Dieser Inzuchtstamm ist homozygot für das *rd* (retinal degeneration) Gen, welches progressiv zu reduziertem Sehvermögen führt.

Der Stamm wurde 2003 von HARLAN/Winkelmann (Borchen) geliefert und seitdem im Zentralen Tierlabor der Universität Magdeburg durch Bruder-Schwester-Verpaarung gezüchtet.

### NMRI

Die benötigten Tiere dieses Auszuchtstammes wurden von HARLAN/Winkelmann (Borchen) geliefert und nicht weitergezüchtet. NMRI-Mäuse sind Albinotiere und eignen sich besonders gut als Embryorezipienten.

## **1.2 Versuchstierhaltung**

Die Haltung der Tiere erfolgt im Zentralen Tierlabor der Universität Magdeburg unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5\%$ .

In der Versuchstieranlage existiert ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus, wobei die Tagphase (8 Stunden) morgens um 8.00 Uhr beginnt und nachmittags um 16.00 Uhr endet. Zwischen Tag- und Nachtphasen existiert ein zweistündiger Dämmerungszustand.

Die Jungtiere werden im Alter von 4-5 Wochen von ihren Eltern entwöhnt, die Geschwister werden nach Geschlecht getrennt und zu maximal 6 Tieren in einem Käfig gehalten.

Die Mäuse werden in Typ III Makrolon-Käfigen gehalten und haben Futter und Wasser zur freien Verfügung.

## 2. Embryotransfer

Um den Einfluss von maternalen und genetischen Faktoren auf das Verhalten der Nachkommen zu untersuchen, werden reziproke Embryotransfers mit den drei Mäusestämmen durchgeführt, das heißt, Blastozysten eines jeden Stammes werden in Rezipienten eines jeden Stammes transferiert (Abb.4).

Bei der Bezeichnung der insgesamt 9 Transfergruppen wird zuerst der Stamm des Embryo-Donators angegeben und anschließend der Empfängerstamm, z.B. C3H in DBA für den Transfer von C3H-Blastozysten in DBA-Leihmütter.

Der Embryotransfer wird nach der Methode von *McLaren und Michie* (1956) durchgeführt, welche in *Nagy et al.* (2003) ausführlich dargestellt ist.

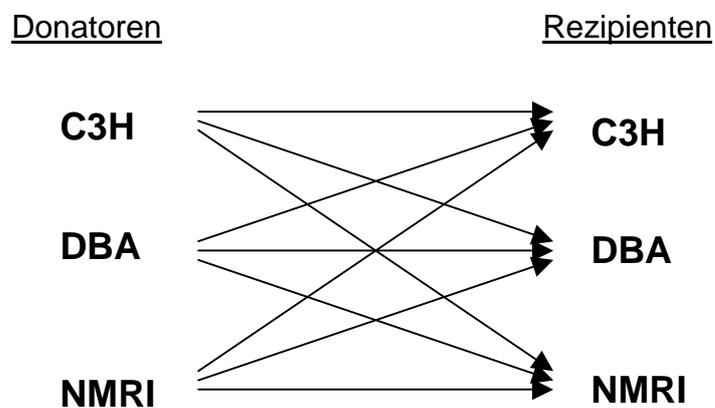


Abb.4. Reziproke Embryotransfers der drei Mäusestämme

### 2.1 Vasektomie

Zur Herstellung von scheinträchtigen Weibchen für den Embryotransfer werden vasektomierte Männchen benötigt, bei denen die Samenleiter durchtrennt sind. Dazu werden NMRI-Männchen im Alter von 10 Wochen verwendet.

Nach einer gewichtsabhängigen Narkose mit Ketazol (Ketamin-Xylazin-Kombination mit 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 16 mg/kg Körpergewicht Xylazin) wird der Bauch des Männchens kurz oberhalb der Penismuskulatur rasiert und das Operationsfeld mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Durch einen transversalen ca. 0,5 cm langen Haut- mit anschließendem Muskelschnitt wird die Bauchhöhle geöffnet. Der Hoden wird vorsichtig in den Bauchraum gedrückt. Mit einer stumpfen Pinzette wird der testikuläre Fettkörper aus der Körperhöhle

gezogen, wobei der Hoden möglichst im Bauchraum verbleiben sollte (Nebenhoden wird mit nach außen gelagert). Im Hodenfett liegt als Schlaufe der Ductus deferens, von dem mit Hilfe eines Kauters ein ca. 1 cm langes Stück entfernt wird. Der Hoden wird vorsichtig in die Bauchhöhle zurückgelagert und der Vorgang wird mit dem zweiten Samenleiter wiederholt. Anschließend wird getestet, ob die Hoden wieder in das Skrotum zurückrutschen. Die Bauchdecke wird vernäht, die Haut geklammert und das Tier auf eine Wärmeplatte zum Aufwachen gelegt. Das Entfernen der Klammern erfolgt nach 5 Tagen. Nach einer zweiwöchigen Erholungsphase werden die Männchen auf ihre Sterilität getestet durch eine 1:2-Verpaarung mit geschlechtsreifen Weibchen. Die vasktomierten Männchen sind 1-1½ Jahre einsetzbar und können zweimal pro Woche zur Paarung herangezogen werden. Während der Verpaarungen erfolgt eine Kontrolle der Häufigkeit der Kopulationen anhand der auftretenden vaginalen Proben der Weibchen.

## 2.2 Medien für die Embryokultur

Für die Kultur von Mäuseembryonen werden zwei Zellkulturmedien verwendet, welche modifizierte Krebs-Ringer Bicarbonat-Lösungen sind. Im Inkubator wird M16-Medium benutzt, bei welchem der pH-Wert durch Begasung mit CO<sub>2</sub> eingestellt wird. Beim M2-Medium wird ein Teil des Bicarbonats durch HEPES-Puffer ersetzt und es dient zum Arbeiten außerhalb des CO<sub>2</sub>-Inkubators.

### 2.2.1 Herstellung der Stocklösungen

Zur Herstellung der Medien werden 5 Stocklösungen angesetzt:

• Lösung A:			g/100ml
(10×)	NaCl	94,66 mM	5,534
	KCL	4,78 mM	0,356
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,71 mM	0,162
	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	1,19 mM	0,293
	Natriumlaktat		4,349
	(60% Sirup)		(=3,35ml)
	Glucose	5,56 mM	1,000
	Penicillin		0,060
	(767 IU/mg)		
	Streptomycin		0,050
	(1580 IU/mg)		

• Lösung B: (10×)	NaHCO <sub>3</sub> Phenolrot	4,15 mM	g/100ml 2,101 0,003
• Lösung C: (100×)	Natriumpyruvat	0,33 mM	g/10ml 0,036
• Lösung D: (100×)	CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	1,71 mM	g/10ml 0,252
• Lösung E: (10×)	HEPES Phenolrot	20,85 mM	g/100ml 5,958 0,003

Die benötigten Reagenzien und Lösungen für die Embryokultur werden von Fluka (Seelze) und Sigma (München) bezogen und sind größtenteils Embryo-getestet.

Die Lösungen B und C sind alle zwei Wochen frisch anzusetzen, die übrigen sind zwei Monate haltbar. Die Lagerung erfolgt generell bei 6°C in 10 ml- und 50 ml-Falconröhrchen.

### 2.2.2 Sterilfiltration

Die Sterilfiltration erfolgt unter einer sterilen Werkbank.

Kleine Volumina werden mit einer Spritze durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Schleicher und Scheli; Bezug durch Fisher Scientific, Schwerte) filtriert. Sowohl die konzentrierten Stocklösungen als auch die Kulturmedien werden nach dem Ansetzen sterilfiltriert.

### 2.2.3 Herstellung der Medien aus konzentrierten Stocklösungen

Das Ansetzen der Medien erfolgt unter einer sterilen Werkbank.

M2-Medium:

(100ml)	Lösung A	10,0 ml
	Lösung B	1,6 ml
	Lösung C	1,0 ml
	Lösung D	1,0 ml
	Lösung E	8,4 ml
	H <sub>2</sub> O	78,0 ml
	BSA	400 mg

M16-Medium: (100ml)	Lösung A	10,0 ml
	Lösung B	10,0 ml
	Lösung C	1,0 ml
	Lösung D	1,0 ml
	H <sub>2</sub> O	78,0 ml
	BSA	400 mg

Bei der Herstellung des M2-Mediums wird das BSA gleich dazugegeben, beim M16-Medium erfolgt vor BSA-Zugabe die Einstellung des pH-Wertes.

Die Medien sind bei 6°C zwei Wochen haltbar.

#### *2.2.4 Einstellung des pH-Wertes*

Bei dem M2-Medium wird der pH-Wert mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Beim M16-Medium erfolgt die Einstellung des pH-Wertes durch Begasung mit CO<sub>2</sub>. Die CO<sub>2</sub>-Einleitung wird optisch kontrolliert, das heißt, es wird so lange CO<sub>2</sub> zugegeben, bis das Medium die gleiche Farbe hat wie das M2-Medium.

#### *2.2.5 Bestimmung der Osmolarität*

Die Bestimmung der Osmolarität erfolgt mit dem Osmomat 030 (Gonotec, Berlin).

Für Eichung und Probenbestimmung werden je 150 µl Flüssigkeit verwendet. Es erfolgt immer eine Doppelbestimmung der Probe.

Als Richtwerte für die Osmolarität der Medien dienen:

M2 = 0,280 – 0,290 mOsmol/kg

M16 = 0,292 – 0,300 mOsmol/kg

### **2.3 Blastozystengewinnung aus Spendertieren**

Bei den Spenderweibchen, aus welchen die Blastozysten gewonnen werden, wird zur Steigerung der Ausbeute und zur Synchronisation der Zyklen eine Superovulation induziert. Dies erfolgt durch intraperitoneale Gabe von 5 Einheiten (0,1 ml) Pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) (Ovogest<sup>®</sup>, Intervet) zur Stimulation der Follikelreife, gefolgt von 5 Einheiten (0,1 ml) menschlichem Choriogonadotropin (HCG) (Intergonan<sup>®</sup>, Intervet) zur Stimulierung der Ovulation 48 Stunden später. Die Gabe der Hormone erfolgt in Abhängigkeit des Tag/Nacht-Rhythmus des Tierlabors.

Nach der HCG-Gabe wird das Weibchen sofort mit einem paarungsfähigen Männchen des selben Stammes über Nacht zusammengesetzt. Am nächsten Morgen werden die Weibchen früh morgens auf die Anwesenheit eines Vaginalpropfs untersucht, welcher die vorangegangene Kopulation anzeigt (Abb.5). Der Vaginalpropf besteht aus einem Sekret der Koagulationsdrüse und Spermien, das sich nach Kontakt mit der Luft innerhalb weniger Minuten zum Propf verhärtet und bis zu 12 Stunden im Genitale bleiben kann. Der Propf verhindert den Samentrückfluss, des Weiteren hindert er Rivalen an einer Kopulation. Der Morgen nach der Paarung wird als Tag 1 der Schwangerschaft bezeichnet. Nicht gepaarte Weibchen können nach zwei Wochen nochmals zur Verpaarung herangezogen werden, jedoch ist diese für gewöhnlich nur bei 25-50% der Tiere erfolgreich (Nagy et al., 2003).

**VP<sup>+</sup>****VP<sup>-</sup>**

Abb.5. Vaginalpropf (VP) als Bestätigung der vorangegangenen Paarung

Drei Tage später werden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, das Peritoneum geöffnet und Uterus, Ovarien und Ovidukt vom Fettgewebe freipräpariert. Der Uterus wird oberhalb der Cervix durchtrennt und die beiden Uterushörner, welche mit den Ovidukten in Verbindung stehen, werden in ein 6 cm-Petrischälchen mit einem Tropfen M2-Medium bei Raumtemperatur überführt. Unter dem Sektionsmikroskop (Leica MZ 7<sub>5</sub>, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Schweiz) wird das Fettgewebe mit Hilfe einer Mikroschere entfernt, das Infundibulum (trichterförmige Öffnung des Ovidukts) aufgesucht und mittels einer mit M2-Medium gefüllten 1 ml-Spritze mit sehr dünner stumpfer Kanüle (0,20 × 0,25 mm, Unimed, Lausanne, Schweiz) werden die Blastozysten aus Ovidukt und Uterus gespült. Die Blastozysten werden mit Hilfe einer Arbeitspipette mit Mundstück (Dr. Gündel, Bio Medical Instruments, Zöllnitz) dreimal in M2-Medium gewaschen, auf ihre Qualität hin überprüft und anschließend bis zum Transfer in IVF-Schälchen (Falcon; Vertrieb durch Neolab, Heidelberg) mit M16-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (Kleininkubator C42, Labotect, Göttingen).

## 2.4 Herstellung pseudoschwangerer Empfängertiere

Da bei Mäusen eine luteale Phase im Östruszyklus fehlt, ist eine Reizung der Cervix notwendig, um das Corpus luteum nach der Ovulation zu aktivieren. Deshalb wird bei den Empfängerweibchen durch Paarung mit einem vasktomierten Männchen eine Scheinschwangerschaft induziert.

Zur Erzeugung einer Scheinschwangerschaft werden Weibchen im Östrus (sichtbar an Rötung und Schwellung der Vagina; Champlin et al., 1973) über Nacht 2:1 mit vasktomierten Männchen verpaart und am nächsten Tag auf Anwesenheit eines Vaginalpropfs untersucht. Hat eine Paarung stattgefunden, so werden diese Weibchen zwei Tage später als Empfängertiere verwendet. Der Unterschied von einem Schwangerschaftstag zwischen Donor und Empfänger soll die Verzögerung in der Embryonalentwicklung kompensieren, welche durch die Manipulationen des Embryotransfers verursacht wird. Empirisch resultiert dies in einem höheren Prozentsatz von Implantationen (McLaren und Michie, 1956).

Nicht benötigte pseudoschwangere Weibchen werden nach drei Wochen wieder verwendet.

Abb.6 zeigt den zeitlichen Ablauf der Hormonbehandlung und Verpaarungen.

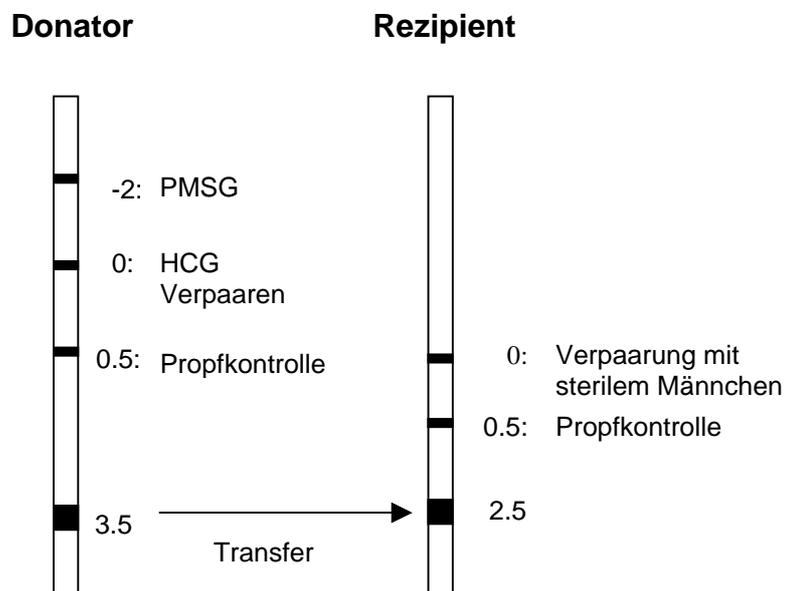


Abb.6. Zeitverlauf der Hormonbehandlung und der Verpaarungen beim Embryotransfer

## 2.5 Blastozystentransfer

Für den Transfer werden die Empfängertiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketazol narkotisiert, der Rücken des Tieres wird rasiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Es erfolgt ein dorsaler longitudinaler Hautschnitt von ca. 0,5 cm etwas unterhalb des letzten Rippenbogens mit anschließendem Spreizen des Unterhautgewebes. Das Ovar ist durch die semi-transparente Abdominalwand leicht erkennbar. Es folgt ein Muskelschnitt seitlich über dem Ovar und der Fettkörper des Ovars wird mit einer Pinzette aus dem Einschnitt gezogen, wobei Ovar, Ovidukt und der obere Teil des Uterushorns mit aus der Bauchhöhle ausgelagert werden. Der Uterus wird auf eine Filterunterlage gelegt und am Fettkörper wird eine kleine Klammer befestigt, um zu verhindern, dass der Uterus wieder ins Peritoneum zurückgleitet. Das entsprechende Ovar wird auf eine Pseudoschwangerschaft untersucht, welche sich durch die Anwesenheit eines hellroten Corpus luteums zeigt. Die Transferpipette (Dr. Gündel, Bio Medical Instruments, Zöllnitz) wird mit den Blastozysten beladen, wobei eine Luftblase das Ende der zu transferierenden Blastozystenlösung anzeigt. Unter einem Operationsmikroskop (Leica M651, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Schweiz) erfolgt die Nadelpunktion des Uterus in das endometriale Lumen mit einer leicht angewinkelten Insulinspritze (Omnikon, Heiland Vet Pharma, Hamburg) nahe der uterotubalen Verbindung. Nach Entfernung der Nadel wird die Transferpipette in das Punktionsloch eingeführt und die Blastozysten mit einer minimalen Menge an M16-Medium in das Uteruslumen transferiert, bis sich die Luftblase im Uterus befindet. Die Rezipienten erhalten 8-14 Embryonen in ein Uterushorn. Theoretisch könnte man die Blastozysten auch auf beide Uterushörner verteilen, jedoch bedeutet dies zwei Schnitte und ist für das Tier entsprechend belastender.

Nach erfolgtem Transfer werden die Reproduktionsorgane wieder zurück in die Bauchhöhle gelagert, der Muskelschnitt wird mit einem selbstaflösenden sterilen Faden (Bondek Plus, Genzyme, Neu-Isenburg) genäht und die Oberhaut mit Wundklammern verschlossen. Anschließend wird das Operationsgebiet mit Brohmol (Heiland Vet Pharma, Hamburg) desinfiziert. Das Tier wird zum Aufwachen auf eine Wärmeplatte gelegt und die Klammern werden nach 5 Tagen entfernt.

Nach der Geburt wird die Wurfgröße (wenn nötig) auf 8 Tiere reduziert, um mögliche Ernährungseffekte auf die zu untersuchenden phänotypischen Merkmale auszugleichen. Die Jungtiere werden bis zur Entwöhnung im Alter von drei Wochen bei ihren Leihmüttern belassen. Danach erhalten sie eine Ohrlochmarkierung und die Geschwister werden nach Geschlecht getrennt in Käfigen zu maximal 5 Tieren gehalten.

## 2.6 Jungenaustausch

Um die maternalen Effekte in uterine und postnatale Faktoren unterteilen zu können, wird eine weitere Gruppe eingeführt, bei welcher NMRI-Blastozysten in C3H-Rezipienten transferiert werden und die Neugeborenen einen Tag nach der Geburt einer NMRI-Amme untergesetzt werden (Gruppe NMRI in C3H in NMRI). Diese NMRI-Tiere verbringen also nur ihre pränatale Zeit in der maternalen Umwelt einer C3H-Mutter.

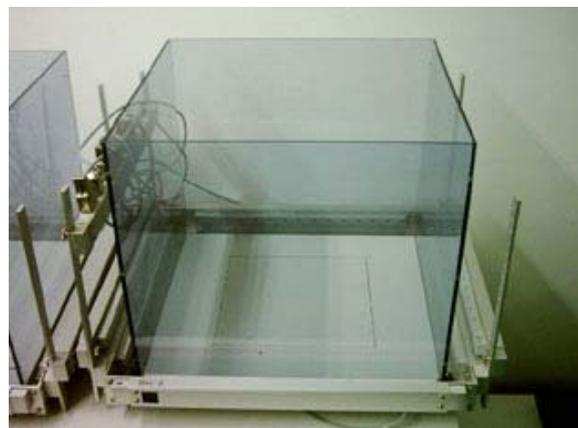
## 3. Verhaltensuntersuchungen

Drei unterschiedliche Tests werden verwendet, um auf Angst basierendes Verhalten zu untersuchen. Die Anordnung der Verhaltenstests ist so gewählt, dass die am wenigsten invasiven Untersuchungen zuerst erfolgen, um zu verhindern, dass Verhaltensantworten durch vorherige Tests verändert werden (McIlwain et al., 2001).

Getestet werden 17 Tiere pro Transfergruppe und zusätzlich dieselbe Anzahl von un- behandelten Kontrolltieren eines jeden Stammes. Sind in einer Transfergruppe mehr als 17 Nachkommen vorhanden, so werden bevorzugt die Würfe getestet, deren Wurfgröße in etwa derjenigen der unbehandelten Kontrolltiere entspricht. Auch wird darauf geachtet, dass das Verhältnis der Geschlechter ausgewogen ist.

Die Verhaltensuntersuchungen begannen in einem Alter von 10 Wochen und wurden immer zur gleichen Tageszeit zwischen 8.00 Uhr und 12.00 Uhr durchgeführt.

### 3.1 Motilitätsbox



#### Abb.7. Motilitätsbox

Zur Habituation werden die Tiere in ihren Käfigen zwei Stunden vor Testbeginn in den Versuchsraum gebracht, welcher abgedunkelt wird, sodass in der Arena der Boxen eine Lichtintensität von  $< 5$  Lux vorliegt (mit einem Luxmeter gemessen).

Das Testsystem besteht aus drei nebeneinander stehenden Acrylboxen ( $45 \times 45 \times 45$  cm), welche nach oben hin offen sind und mit denen drei Mäuse gleichzeitig getestet werden können (Abb.7). Die Bewegung des Tieres wird mit Hilfe von 15 Infrarot-Sensorpaaren detektiert, welche in Streifen mit einer Distanz von 2,8 cm in der x- und y- Dimension 2,5 cm über dem Boden der Box angeordnet sind. Die vertikale Aktivität (Aufrichtungen der Tiere und Anlehnungen an die Wände) wird durch Infrarot-Sensoren in der z-Dimension gemessen, welche sich 4 cm über denjenigen befinden, welche die Bewegung in x- und y- Dimension dokumentieren.

Die Hard- und Software stammt von TSE-Systems, Bad Homburg.

Zu Testbeginn wird die Maus in die Mitte der Box gesetzt und der Experimentator verlässt anschließend sofort den Raum. Die Maus kann nun 10 Minuten lang ungestört ihre Umgebung erkunden. Die Unterbrechung der Infrarot-Sensoren durch die Bewegung des Tieres wird mit einer Sampling-Rate von 10 Hz aufgezeichnet, als x-, y- und z-Koordinaten in einem PC gespeichert und mit Hilfe der Software in die gesamte Bewegungsaktivität umgewandelt. Am Ende des Tests wird die Maus in ihren Käfig zurückgebracht und die Box gereinigt.

Die Testzeit beträgt für jedes Tier 10 Minuten, die Daten werden jedoch für zwei 5-Minuten-Abschnitte getrennt ausgewertet.

Folgende Verhaltensparameter werden von der Software kalkuliert:

1. mit horizontalen Bewegungen verbrachte Zeit
2. zurückgelegter Weg
3. Anzahl von vertikalen Bewegungen (Aufrichtungen/Anlehnungen an die Wände)
4. mit vertikalen Bewegungen verbrachte Zeit
5. in der Mitte der Box verbrachte Zeit.

### 3.2 Elevated Plus Maze

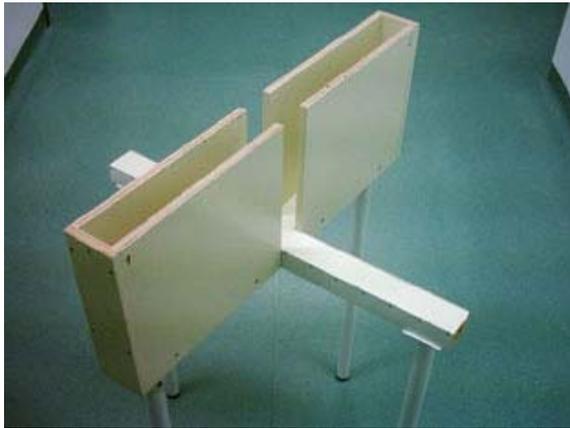


Abb.8. Elevated Plus-Maze

Eine Woche nach dem Test in der Motilitätsbox werden die Tiere auf dem Elevated Plus-Maze (EPM) getestet. Die Mäuse werden wiederum zwei Stunden vor dem Test in ihren Käfigen in den Versuchsraum zur Habituation gebracht.

Das Maze besteht aus einer Plus-förmigen Plattform aus weiß gestrichenem Holz, welche sich 75 cm über dem Boden befindet. Die vier Arme ( $30\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ ) sind durch ein Zentrum ( $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ ) verbunden und werden von einer weißen Glühbirne beleuchtet, welche eine mittlere Lichtintensität von 60 Lux auf allen Armen liefert (mit dem Luxmeter gemessen). Zwei der gegenüberliegenden Arme werden als „geschlossene Arme“ bezeichnet, da sie 40 cm hohe Seiten- und Endwände besitzen, wohingegen die anderen beiden Arme als „offene Arme“ bezeichnet werden, da sie nur 0,5 cm hohe Ränder aufweisen (Abb.8).

Zu Beginn des Tests wird die Maus so ins Zentrum der Apparatur gesetzt, dass sie in einen geschlossenen Arm sieht. Die Maus kann nun für 5 Minuten die Apparatur frei erkunden, während der Experimentator einen Computer benutzt, der sich in einer Entfernung von 2 m zur Apparatur befindet, um die Eintritte in die verschiedenen Kompartimente des Maze mittels eines eigens dafür entworfenen Computerprogramms basierend auf der Programmiersprache C++ (Dipl.-Ing. C. Kurtz, Institut für Anatomie, Universität Magdeburg) zu dokumentieren. In diesem Computerprogramm wurde jedem Arm sowie dem Zentrum je eine Nummer gegeben und der Experimentator drückt diese Zahl beim Eintritt der Maus in das entsprechende Kompartiment. Für einen Eintritt in ein Kompartiment muss die Maus dieses mit allen vier Pfoten betreten haben. Am Ende einer Verhaltensmessung wird das Tier zurück in seinen Käfig gesetzt und das Maze mit Wasser gereinigt, welchem ein Detergenz zugesetzt wurde. Die Software berechnet anschließend die Anzahl der Eintritte und die verbrachte Zeit auf den verschiedenen Positionen des Maze.

### 3.3 Sensitivierung der akustischen Schreckreaktion



Abb.9. Testapparatur für die akustische Schreckreaktion

Eine Woche nach dem Test auf dem EPM wird die Sensitivierung der akustischen Schreckreaktion gemessen. Dies erfolgt im Haltungsraum der Tiere, sodass keine Habituation nötig ist.

Zwei schallisolierte Kammern ( $100 \times 80 \times 60$  cm) werden für die Messung der akustischen Schreckreaktion benutzt, wodurch zwei Mäuse gleichzeitig getestet werden können. Die Kammern werden von einer kalten Glühbirne (5 W) beleuchtet und sind von außen durch ein Glasfenster gut einsehbar. Die Mäuse werden in einen engen Maschendrahtkäfig ( $8 \times 5 \times 5,5$  cm) gesetzt, welcher auf einer piezoelektrischen Übertragungsplattform innerhalb der schallisolierten Kammer befestigt wird (Abb.9). Akustische Stimuli werden durch einen digitalen Funktionsgenerator produziert und über einen Lautsprecher übertragen, welcher sich in einem Abstand von 49 cm vom Tier befindet. Der Output des Transducer-Systems wird amplifiziert und von 3 bis 500 Hz gefiltert. Die resultierende Spannung wird digitalisiert und durch ein Microcomputer-System analysiert. Die Amplitude der Schreckreaktion wird als die Peak-zu-Peak-Spannung genommen, welche durch das Transducer-System während eines Zeitfensters von 80 ms nach Stimuluseinsatz geliefert wird. Von diesem Wert wird die Peak-zu-Peak-Spannung in dem 80 ms-Zeitfenster vor dem Stimuluseinsatz subtrahiert. Die elektrischen Stimuli werden mit einem dafür entworfenen Gleichstrom-Generator erzeugt, welcher sich außerhalb der Kammer befindet.

Tiere von jeder Transfergruppe werden abwechselnd in den beiden Kammern getestet.

Jede Messung besteht aus einer 5-minütigen Akklimatisations-Periode in der Kammer, in welcher ein 55 dB lautes Geräuschdruckpegel (SPL RMS; sound pressure level root mean square) Hintergrundgeräusch mit einer Bandbreite von 2-40 kHz präsentiert wird. Nach der Akklimatisationsperiode werden 40 akustische Stimuli (100 dB SPL RMS Pulse bei 10

kHz mit einer Dauer von 20 ms, einschließlich 0,4 ms Anstieg-/Abfallzeiten) über das Hintergrundgeräusch in Intervallen von 20 s aufgesetzt. Anschließend werden 10 elektrische Fußschocks von 0,75 mA und einer Dauer von 500 ms in Intervallen von 1 s durch Eisenstangen präsentiert, welche sich gleichmäßig in einem Abstand von 0,5 cm auf dem Boden des Maschendrahtkäfigs befinden. 10 Sekunden nach dem letzten Fußschock werden weitere 30 akustische Stimuli mit einem Interstimulus-Intervall von 20 s gegeben.

Die Amplituden der Schreckreaktion von Blöcken von 10 Stimuli werden zusammengefasst und als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. für jede Transfergruppe sowie die unbehandelten Kontrollgruppen eines jeden Stamms angegeben. Die „sofortige Sensitivierung“ des Reflexes wird berechnet als die Differenz zwischen dem Mittelwert des ersten Blockes nach den Fußschocks (Block 5) und dem Mittelwert des letzten Blockes vor den Fußschocks (Block 4). Die „gesamte Sensitivierung“ wird berechnet als die Differenz zwischen dem Mittelwert aus allen Blöcken nach den Fußschocks (Block 5 bis Block 7) und dem Mittelwert aus den zwei letzten Blöcken vor den Fußschocks (Block 3 und Block 4).

#### **4. Perfusion und Gehirnentnahme**

Eine Woche nach dem letzten Verhaltenstest werden die Mäuse transkardial perfundiert. Dazu wird eine Überdosis Pentobarbital (0,15 ml) intraperitoneal injiziert. Sobald kein Fußsehnenreflex mehr vorhanden ist, wird der Brustraum geöffnet, eine dünne Injektionskanüle in den rechten Vorhof des Herzens eingeführt und das rechte Atrium geöffnet.

Zuerst wird das Blut des Tieres durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt, anschließend erfolgt die Fixierung mit einer Mischung aus 4% Paraformaldehyd, 15% gesättigter Pikrinsäure und 0,1% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,35).

Nach der etwa 5-8 minütigen Perfusion erfolgt eine Dekapitation, das Gehirn wird entnommen und über Nacht durch Immersion in 4% Paraformaldehyd und 15% gesättigter Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer nachfixiert. Nach dieser Immersionsfixierung werden die Gehirne in einer 20%igen Saccharose-Lösung (in 0,1 M Phosphatpuffer) inkubiert, bis diese abgesunken sind. Anschließend werden sie mit Hilfe von eiskaltem Butanol schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **5. Immunhistochemie**

Von den Gehirnen werden serielle Kryostatschnitte (3 Serien) bei  $-9^{\circ}\text{C}$  mit einer Dicke von  $40\ \mu\text{m}$  hergestellt. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in  $0,1\ \text{M PB}$  (je 10 min) wird für jedes Gehirn eine Serie auf Objektträger gezogen und mit Cresyl-Violett Nissl-gefärbt, um eine Identifizierung der Amygdalakerengebiete zu erlauben. Die beiden verbleibenden Serien werden als freiflotierende Schnitte für die Immunzytochemie (NPY und PARV) verwendet und bis zur Weiterverarbeitung in einer kryoprotektiven Lösung (9% Ethylenglycol und 6,25% Glycerin in  $0,05\ \text{M PB}$ ) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **5.1 Neuropeptid Y (NPY)-Färbung**

Die Schnitte werden aus der kryoprotektiven Lösung genommen und viermal für 10 Minuten mit  $0,1\ \text{M PB}$  gespült. Die endogene Peroxidase-Aktivität durch eine 10-minütige Inkubation in einer Mischung aus 5% Methanol und 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $0,1\ \text{M Phosphatpuffer}$  unterdrückt. Nach nochmaligem Spülen der Schnitte (viermal für 10 Minuten mit  $0,1\ \text{M PB}$ ) erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper [polyklonaler NPY-Antikörper aus der Ziege, 1:300 in  $0,1\ \text{M PB}$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA)] für 48 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler. Im Anschluss erfolgt ein weiterer Spülgang (dreimal für 10 Minuten mit  $0,1\ \text{M PB}$ ) und die Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Antikörper [bio  $\alpha$  goat aus dem Kaninchen, 1:200 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)] bei Raumtemperatur für 60 Minuten auf dem Schüttler. Nach einem weiteren Spülschritt (dreimal für 10 Minuten mit  $0,1\ \text{M PM}$ ) erfolgt die Reaktion mit dem makromolekularen Komplex aus Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (Vectastain Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 1,5 Stunden auf dem Schüttler und anschließendem Spülen der Schnitte (dreimal für 10 Minuten). Durch eine 3-minütige Reaktion von Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB,  $1\ \text{mg}/1\ \text{ml}$ ) mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,0075%) wird die Immunfärbung sichtbar gemacht. Die Schnitte werden nochmals in  $0,1\ \text{M PB}$  gewaschen, auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht in den Trockenschrank gestellt. Am nächsten Tag werden sie mit Balsam eingedeckt.

## **5.2 Parvalbumin (PARV)-Färbung**

Auch hier werden die Hirnschnitte nach Entnahme aus der kryoprotektiven Lösung gespült und die endogene Peroxidase wird blockiert. Als primärer Antikörper wird eine 1:5000-Verdünnung eines monoklonalen PARV-Antikörpers aus der Maus verwendet (Swant, Swiss antibodies, Bellinzona, Schweiz), welcher in 0,1 M PB mit 1% normalem Pferdeserum und 0,01% Natrium-Azid gelöst ist. Als sekundärer Antikörper dient ein biotinylierter Maus-Antikörper aus dem Pferd (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:200, dessen Inkubationszeit 1,5 Stunden beträgt. Die Immunfärbung wird mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) und Diaminobenzidin als Chromogen sichtbar gemacht.

Für jeden Antikörper wird ein negativer Kontrollschnitt angefertigt, bei welchem der primäre Antikörper in der Prozedur weggelassen wird und der deshalb nur unspezifische Färbungen aufweist.

Die Gehirnschnitte von Mäusen verschiedener Transfergruppen werden zur selben Zeit gefärbt, um abweichende Färbungen zwischen den Gruppen zu vermeiden.

## **6. Quantifizierung der Neurone**

Es wird die Nomenklatur der Amygdalakerne von *Pitkänen et al.* (1995) sowie der Atlas des Rattengehirns von *Swanson* (1992) verwendet.

Die Gehirnschnitte der Mäuse aus verschiedenen Gruppen werden kodiert, sodass der Untersucher nicht weiß, um welche Gruppe es sich bei einem vorliegenden Gehirn handelt. Die Amygdalakerengebiete in beiden Hemisphären des Gehirns werden ausgezählt, die Grenzen der Amygdalakerne in den Immunhistochemie-Schnitten werden durch einen Vergleich mit den entsprechenden Nissl-gefärbten Schnittserien identifiziert.

Die NPY- und PARV-immunreaktiven Neurone werden im lateralen, basolateralen und basomedialen sowie im zentralen Kern der Amygdala bestimmt. Der zentrale Kern wird dabei noch in kapsulären, lateralen und medialen Unterkern unterteilt.

Alle immungefärbten Neurone in den entsprechenden Kernen werden bei 20facher Vergrößerung mit einem Axioplan-Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) gezählt. Der „Optical Dissector“ wird hierbei nicht verwendet, da die Anzahl der immunpositiven Neurone in den entsprechenden Kerngebieten übersichtlich ist.

Da die Gehirne in drei Serien geschnitten und gefärbt werden (1. Serie = Nissl-Färbung, 2. Serie = PARV-Färbung und 3. Serie = NPY-Färbung) und jede Schnittserie komplett ausgewertet wird, erfolgt also systematisch die Bestimmung der Anzahl immunpositiver Neurone in jedem dritten Schnitt. Zur Ermittlung der Zellzahlen im gesamten Gehirn wird deshalb die Anzahl der in jedem Kern gezählten immunpositiven Neurone mit drei multipliziert. Die Anzahl der ermittelten immunpositiven Neurone einer Gruppe wird als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. für jeden Kern oder Unterkern ausgedrückt.

Bei der PARV-Färbung waren bei einigen Gehirnschnitten Teile des Schnittes schlecht gefärbt. Bei diesen Gehirnen wird die Anzahl immunpositiver Neurone nur in den Amygdalakernen der gut gefärbten Gehirnhälfte ermittelt und anschließend das Ergebnis mit zwei multipliziert.

## **7. Statistische Auswertung**

Die Berechnungen erfolgen mit dem Programmpaket der Firma SAS (SAS Institute Inc., Version 8,2).

Alle untersuchten Kriterien stellen stetige Parameter dar.

Zum Vergleich zweier Gruppen werden t-Tests verwendet, speziell der Welsch-Test, da keine grundsätzliche Gleichheit der Varianzen vorliegt. Mehrgruppenvergleiche erfolgen mittels varianzanalytischer Verfahren und werden unter Verwendung der Prozedur GLM (generalized linear models) durchgeführt. Es wird zunächst eine drei-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Diejenigen Parameter, welche in der drei-faktoriellen ANOVA signifikante Effekte aufweisen, werden anschließend mit Hilfe von ein-faktoriellen ANOVAs detaillierter untersucht. Nachfolgende paarweise post-hoc Vergleiche erfolgen mit dem Tukey-Test.

Alle statistischen Entscheidungen basieren auf einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Die Betrachtung wird unter Verwendung zahlreicher Merkmale und verschiedener Blickrichtungen durchgeführt. Da diese sich nicht auf einen primären Endpunkt beschränken und diesbezüglich keine  $\alpha$ -Adjustierungen vorgenommen werden, sollten die Ergebnisse im explorativen Sinne interpretiert werden.

## C. Ergebnisse

### I. Stammesunterschiede beim Erfolg der Embryotransfers

Zwischen den für den Embryotransfer verwendeten Mäusestämmen gab es beträchtliche Unterschiede beim Erfolg der Transfers. Für die Verhaltensuntersuchungen wurden 17 Tiere pro Transfergruppe benötigt, was jedoch bei der Gruppe DBA in DBA nicht gelang.

#### 1. Schwangerschaftsraten

Die Schwangerschaftsrate wurde kalkuliert als der Prozentsatz der Rezipienten, welche tragend wurden und mindestens einen Nachkommen (tot oder lebend) geboren hatten.

Für die Schwangerschaftsraten wurde die Versuchszeit in zwei Hälften aufgeteilt, da zu Versuchsbeginn noch technische Probleme auftraten und deshalb die Erfolgsquoten etwas geringer ausfielen. In der ersten Versuchshälfte betrug die Schwangerschaftsrate 50,94%. Diese Rate konnte dann auf 64,38% gesteigert werden. Über den gesamten Versuch wurde eine Schwangerschaftsrate von 58,73% erreicht (Tab.2).

Die Embryotransfers in NMRI-Rezipienten wurden fast alle in der ersten Versuchshälfte durchgeführt, da diese gleich zu Versuchsbeginn erfolgreich waren. Im Gegensatz dazu erfolgten die Transfers in DBA-Rezipienten fast alle in der zweiten Versuchshälfte, da dieser Stamm schlecht züchtete und die Weibchen sich nur schwer superovulieren ließen, sodass erst zu diesem Zeitpunkt eine genügend hohe Anzahl von Tieren zur Verfügung stand.

Die höchste Schwangerschaftsrate wurde beim isogenen Transfer des Stammes NMRI erreicht (83,33%). Die Schwangerschaftsraten beim Transfer in DBA-Rezipienten waren nicht schlechter als diejenigen der anderen Stämme.

Rezipienten	Donatoren							
	C3H		DBA		NMRI		Gesamt	
C3H	n=20 <sup>a</sup>	40,00% <sup>c</sup>	n=16	40,00%	n=13	62,50%	n=49	47,83%
	<b>60,00%</b> <sup>b</sup>	80,00% <sup>d</sup>	<b>56,25%</b>	63,64%	<b>61,54%</b>	60,00%	<b>59,18%</b>	69,23%
DBA	n=23	66,67%	n=14	/	n=10	/	n=47	50,00%
	<b>69,56%</b>	70,00%	<b>57,14%</b>	57,14%	<b>50,00%</b>	55,56%	<b>61,70%</b>	62,79%
NMRI	n=12	41,67%	n=12	50,00%	n=6	83,33%	n=30	53,85%
	<b>41,67%</b>	/	<b>50,00%</b>	50,00%	<b>83,33%</b>	/	<b>53,33%</b>	50,00%
Gesamt	n=55	44,00%	n=42	46,15%	n=29	66,67%	n=126	50,94%
	<b>60,00%</b>	73,33%	<b>54,76%</b>	58,62%	<b>62,07%</b>	57,14%	<b>58,73%</b>	64,38%

Tab.2. Schwangerschaftsraten bei den reziproken Embryotransfers der Stämme C3H, DBA und NMRI

a = Anzahl durchgeführter Transfers

b = Schwangerschaftsrate über den gesamten Zeitraum

c = Schwangerschaftsrate in der ersten Versuchshälfte

d = Schwangerschaftsrate in der zweiten Versuchshälfte

## **2. Überlebensraten der transferierten Blastozysten**

Die Überlebensrate der Embryonen wurde kalkuliert als der Prozentsatz der transferierten Blastozysten, welche bis zur Geburt oder bis zum Absetzen überlebten. Diese wurde sowohl für die gesamte Anzahl der Rezipienten berechnet, als auch für diejenigen Rezipienten, welche tragend wurden.

### **2.1 Überlebensraten der gesamten transferierten Blastozysten bis zur Geburt**

Insgesamt hatten 21,77% der transferierten Blastozysten bis zur Geburt überlebt (Tab.3). Hierbei erwies sich der Stamm NMRI als bester Embryo-Donator, da diese Blastozysten die höchste Überlebensrate aufwiesen, unabhängig vom Stamm des Rezipienten. Auch als Embryo-Rezipienten wurden mit NMRI-Mäusen die höchsten Überlebensraten erreicht, unabhängig vom Stamm der Embryo-Donatoren. Die höchste Überlebensrate wurde beim isogenen Transfer des Stammes NMRI erzielt.

Der Transfer von Embryonen in DBA-Rezipienten führte zu den schlechtesten Überlebensraten der Embryonen bis zur Geburt. Vor allem beim Transfer von DBA-Blastozysten in DBA-Rezipienten überlebte nur ein sehr geringer Anteil der transferierten Blastozysten. Jedoch war bei dieser Transfergruppe die Anzahl der lebend geborenen Jungen sehr unsicher, da viele tote Jungtiere aufgefunden wurden und nicht bekannt war, ob diese bei der Geburt noch gelebt hatten.

Rezipienten	Donatoren			
	C3H	DBA	NMRI	Gesamt
C3H	n=224 <sup>a</sup> <b>22,77%</b> <sup>b</sup>	n=185 <b>18,38%</b>	n=141 <b>36,17%</b>	n= 550 <b>24,73%</b>
DBA	n=283 <b>14,49%</b>	n=182 <b>9,34%*</b>	n=119 <b>23,53%</b>	n= 584 <b>14,73%</b>
NMRI	n=115 <b>21,74%</b>	n=131 <b>22,90%</b>	n= 62 <b>59,68%</b>	n= 308 <b>29,87%</b>
Gesamt	n=622 <b>18,81%</b>	n=498 <b>16,27%</b>	n=322 <b>36,02%</b>	n=1442 <b>21,77%</b>

Tab.3. Überlebensraten der transferierten Blastozysten bis zur Geburt. Es wurden nur die bei der Geburt lebenden Jungen mit eingerechnet, nicht jedoch die Totgeburten.

a = Anzahl der transferierten Blastozysten

b = Überlebensrate der gesamten transferierten Blastozysten bis zur Geburt

\* Anzahl lebend geborener Jungen unsicher

### **2.2 Überlebensraten der gesamten transferierten Blastozysten bis zum Absetzen**

Insgesamt hatten 17,96% der transferierten Blastozysten die postnatale Zeit überlebt und konnten im Alter von 21 Tagen abgesetzt werden (Tab.4). Der Stamm NMRI zeigte sich auch hier wieder als am besten für den Embryotransfer geeignet, da er sowohl als Embryo-Donator als auch als Embryo-Rezipient die höchsten Überlebensraten der transferierten Blastozysten

aufwies.

Wurden DBA-Weibchen als Embryo-Rezipienten verwendet, so überlebten nur sehr wenige der transferierten Blastozysten bis zum Absetzen. Dies lag nicht nur an der geringen Überlebensrate bis zur Geburt. Etwa die Hälfte der lebend geborenen Tiere der Transfergruppen C3H in DBA und DBA in DBA überlebte die postnatale Zeit nicht, da die Leihmütter die Jungtiere oft nicht säugten und sie teilweise auffraßen oder tottrampelten. Von den neun bis zum Absetzalter überlebenden Jungtieren der Transfergruppe DBA in DBA mussten drei einer DBA-Amme untergesetzt werden, da ihre Leihmutter sie nicht säugte.

Rezipienten	Donatoren			
	C3H	DBA	NMRI	Gesamt
C3H	n=224 <sup>a</sup> <b>20,54%</b> <sup>b</sup>	n=185 <b>14,05%</b>	n=141 <b>36,17%</b>	n= 550 <b>22,36%</b>
DBA	n=283 <b>7,42%</b>	n=182 <b>4,95%</b>	n=119 <b>22,69%</b>	n= 584 <b>9,76%</b>
NMRI	n=115 <b>20,00%</b>	n=131 <b>19,85%</b>	n= 62 <b>48,39%</b>	n= 308 <b>25,65%</b>
Gesamt	n=622 <b>14,47%</b>	n=498 <b>12,25%</b>	n=322 <b>33,54%</b>	n=1442 <b>17,96%</b>

Tab.4. Überlebensraten der gesamten transferierten Blastozysten bis zum Absetzen

a = Anzahl der transferierten Blastozysten

b = Überlebensrate der gesamten transferierten Blastozysten bis zum Absetzen

### 2.3 Überlebensraten der Blastozysten bis zur Geburt in erfolgreichen Schwangerschaften

Bei tragenden Weibchen überlebten 35,8% der transferierten Blastozysten bis zur Geburt (Tab.5). Auch hier erwies sich der Stamm NMRI sowohl als Embryo-Donator als auch als Embryo-Rezipient den anderen Stämmen deutlich überlegen.

Beim Transfer von Embryonen in DBA-Rezipienten überlebten deutlich weniger Embryonen bis zur Geburt, vor allem bei den Transfergruppen DBA in DBA und C3H in DBA.

Rezipienten	Donatoren			
	C3H	DBA	NMRI	Gesamt
C3H	n=137 <sup>a</sup> <b>37,23%</b> <sup>b</sup>	n=112 <b>30,36%</b>	n= 86 <b>59,30%</b>	n=335 <b>40,60%</b>
DBA	n=208 <b>19,71%</b>	n=104 <b>16,35%*</b>	n= 60 <b>46,67%</b>	n=372 <b>23,12%</b>
NMRI	n= 46 <b>54,35%</b>	n= 72 <b>41,67%</b>	n= 52 <b>71,15%</b>	n=170 <b>54,12%</b>
Gesamt	n=391 <b>29,92%</b>	n=288 <b>28,13%</b>	n=198 <b>58,59%</b>	n=877 <b>35,80%</b>

Tab.5. Überlebensraten der transferierten Blastozysten bis zur Geburt in erfolgreichen Schwangerschaften

a = Anzahl der transferierten Blastozysten bei schwangeren Rezipienten

b = Überlebensrate der Blastozysten in schwangeren Rezipienten bis zur Geburt

\* Anzahl lebend geborener Jungen unsicher

## 2.4 Überlebensraten der Blastozysten bis zum Absetzen in erfolgreichen Schwangerschaften

Bei tragenden Weibchen überlebten 29,53% der transferierten Blastozysten bis zum Absetzen (Tab.6). Auch hier erwies sich der Stamm NMRI als am besten für den Embryotransfer geeignet, sowohl als Embryo-Donator als auch als Rezipient.

DBA-Weibchen lieferten sowohl als Embryo-Donatoren als auch als Rezipienten das schlechteste Ergebnis. Bei den Transfergruppen C3H in DBA und DBA in DBA verstarben in der postnatalen Periode etwa die Hälfte der Jungtiere. Dies stand im Gegensatz zu den transferierten NMRI-Blastozysten, welche selbst in DBA-Leihmüttern eine geringe postnatale Sterblichkeit aufwiesen.

Rezipienten	Donatoren			
	C3H	DBA	NMRI	Gesamt
C3H	n=137 <sup>a</sup> <b>3,58%</b> <sup>b</sup>	n=112 <b>23,21%</b>	n= 86 <b>59,30%</b>	n=335 <b>36,72%</b>
DBA	n=208 <b>10,10%</b>	n=104 <b>8,65%</b>	n= 60 <b>45,00%</b>	n=372 <b>15,32%</b>
NMRI	n= 46 <b>50,00%</b>	n= 72 <b>36,11%</b>	n= 52 <b>57,69%</b>	n=170 <b>46,47%</b>
Gesamt	n=391 <b>23,02%</b>	n=288 <b>21,18%</b>	n=198 <b>54,54%</b>	n=877 <b>29,53%</b>

Tab.6. Überlebensraten der transferierten Blastozysten bis zum Absetzen in erfolgreichen Schwangerschaften

a = Anzahl der transferierten Blastozysten bei schwangeren Rezipienten

b = Überlebensrate der Blastozysten in schwangeren Rezipienten bis zum Absetzen

## 3. Durchschnittliche Wurfgröße bei erfolgreichen Schwangerschaften

Die durchschnittliche Wurfgröße aller Transfers betrug 4,68 Tiere (Tab.7). Wurden NMRI-Blastozysten als Embryo-Donatoren verwendet, so führte dies zu größeren Würfen im Vergleich zum Transfer von C3H- oder DBA-Blastozysten, unabhängig vom Stamm des Rezipienten. Der Transfer von Blastozysten in DBA-Leihmütter führte bei Embryo-Donatoren aller Stämme zu einer niedrigeren Wurfgröße, wohingegen der Transfer in NMRI-Rezipienten die größten Würfe lieferte.

Rezipienten	Donatoren			
	C3H	DBA	NMRI	Durchschnitt
C3H	4,25	3,78	6,38	4,80
DBA	2,56	2,13	5,60	3,43
NMRI	5,00	5,00	7,40	5,80
Durchschnitt	3,94	3,64	6,46	4,68

Tab.7. Durchschnittliche Wurfgrößen der reziproken Embryotransfers der Stämme DBA, C3H und NMRI

## II. Verhaltensuntersuchungen

### 1. Vergleich der drei Ausgangsstämme

Zuerst wurde überprüft, ob sich die hier verwendeten Mäusestämme C3H/HeN, DBA/2J und NMRI wie erwartet in ihrem Angstverhalten in der Motilitätsbox, auf dem Elevated Plus-Maze und in der Furcht-sensitiven akustischen Schreckreaktion unterscheiden. Die durchgeführte ANOVA zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Stämmen in allen Verhaltenstests. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen wurden durch post-hoc Tests ermittelt.

Die angegebenen F- und p-Werte beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf die gesamte Testzeit (10 Minuten) in der Motilitätsbox.

#### a) Motilitätsbox

In der Motilitätsbox unterschieden sich die drei Stämme signifikant in der mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit [ $F = 22,10$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], dem zurückgelegten Weg [ $F = 40,16$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], der mit Aufrichtungen verbrachten Zeit [ $F = 51,40$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] und der Anzahl von Aufrichtungen [ $F = 44,94$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], was durch eine ein-faktorielle ANOVA gezeigt wurde.

Die post-hoc Tests ergaben, dass NMRI-Tiere eine längere Zeit mit horizontaler Bewegung verbrachten als die beiden Inzuchtstämme, einen längeren Weg zurücklegten als C3H-Mäuse und sich häufiger aufrichteten und mehr Zeit mit Aufrichtungen verbrachten als die Stämme C3H und DBA (Abb.10a-d).

Im Gegensatz dazu zeigte der Stamm C3H die geringste Aktivität mit der niedrigsten Laufzeit, dem kürzesten zurückgelegten Weg in der Box, einer signifikant geringeren Anzahl von Aufrichtungen und einer kürzeren Zeitperiode, welche mit Aufrichtverhalten verbracht wurde.

Der Stamm DBA wies eine intermediäre Aktivität auf, jedoch gab es beim zurückgelegten Weg in der Box keine signifikanten Unterschiede zwischen DBA- und NMRI-Mäusen in den letzten 5 Minuten des Tests und über die gesamte Testzeit hinweg betrachtet. Auch die mit horizontaler Exploration verbrachte Zeit in den letzten 5 Minuten des Tests unterschied sich nicht signifikant zwischen DBA- und NMRI-Mäusen.

Die im Zentrum der Box verbrachte Zeit als ein Indikator des Angstverhaltens war nur in den ersten 5 Minuten des Tests signifikant unterschiedlich zwischen den Stämmen [ $F = 3,20$ ,

df = 2,  $p < 0,05$ ], wobei sich C3H-Mäuse länger im Zentrum aufhielten als DBA-Mäuse (Abb.10e).

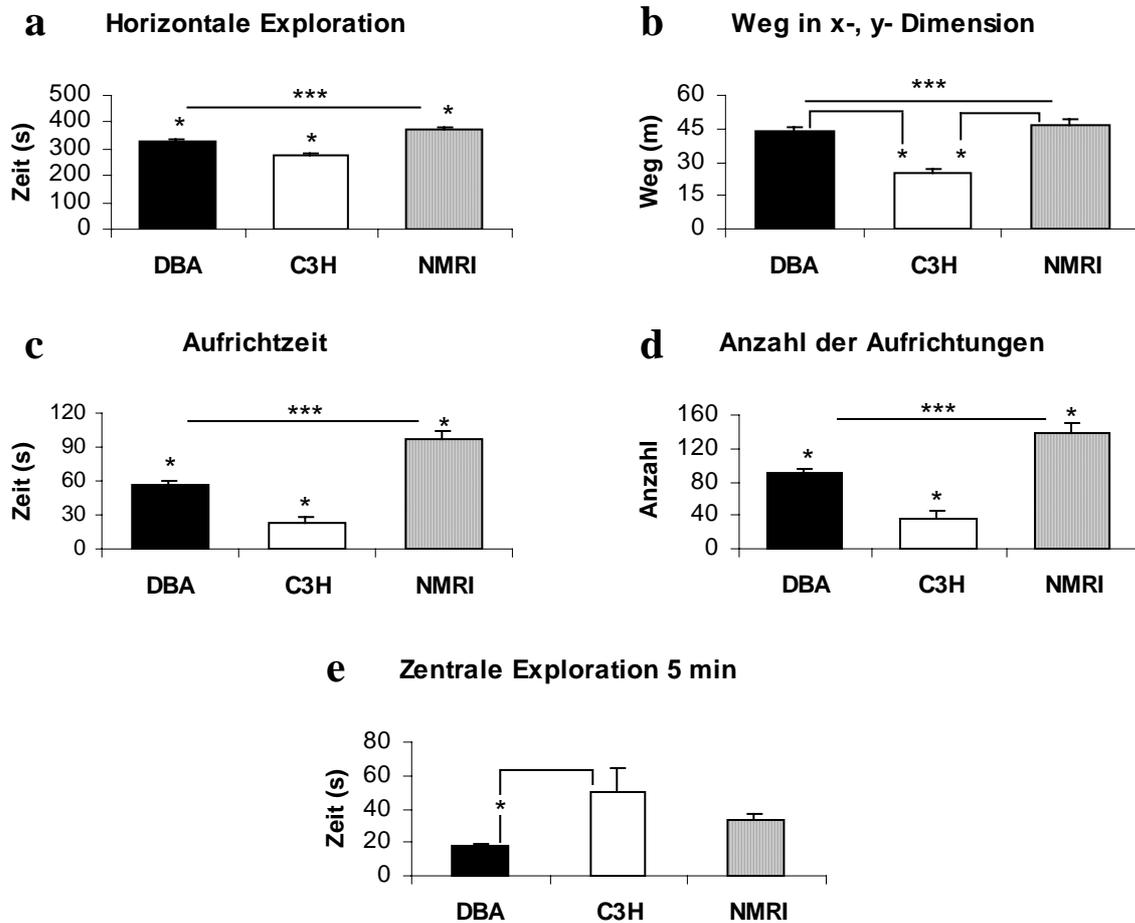


Abb.10. Verhalten der Mäusestämme C3H/HeN, DBA/2J und NMRI in der Motilitätsbox.

In der Motilitätsbox unterschieden sich die unbehandelten Stämme in der durchschnittlich mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit (a), dem durchschnittlich zurückgelegten Weg in der Box (b), der durchschnittlich mit Aufrichtungen verbrachten Zeit (c) und der durchschnittlichen Anzahl von Aufrichtungen (d). Die durchschnittlich im Zentrum der Box verbrachte Zeit unterschied sich nur in den ersten 5 Minuten des Tests zwischen den Inzuchtstämmen DBA und C3H (e).

\* =  $p < 0,05-0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

## b) Elevated Plus-Maze (EPM)

Die ein-faktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Ausgangsstämmen in allen untersuchten Verhaltensparametern des EPM [ $F = 10,76$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme;  $F = 29,31$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme;  $F = 32,97$ ;  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die zentrale Plattform;  $F = 3,55$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,04$  für die verbrachte Zeit in den offenen Armen;  $F = 8,17$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die verbrachte Zeit in den geschlossenen Armen und  $F = 7,98$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die verbrachte Zeit auf der zentralen Plattform des Maze].

Jedoch zeigten die Tukey-Tests, dass sich die Inzuchtstämme DBA und C3H in diesem Verhaltenstest nicht signifikant unterschieden.

NMRI-Mäuse hingegen wiesen signifikant mehr Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme, sowie in das Zentrum des Maze auf als die beiden Inzuchtstämme (Abb.11a). Dies stimmte mit der höheren Aktivität von NMRI-Mäusen in der Motilitätsbox überein.

Die durchschnittlich verbrachte Zeit in den offenen Armen des Maze als ein Maß des Angstverhaltens unterschied sich signifikant zwischen den Stämmen [ $F = 3,55$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,04$ ] (Abb.11b), wie auch die relative verbrachte Zeit in den offenen Armen [ $F = 3,55$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,04$ ] (Abb.11c), was durch eine ein-faktorielle ANOVA gezeigt wurde. Jedoch wurden in den post-hoc Tests nur Unterschiede zwischen den Stämmen NMRI und DBA festgestellt, wobei DBA-Mäuse in diesem Verhaltenstest signifikant „ängstlicher“ waren als NMRI-Mäuse.

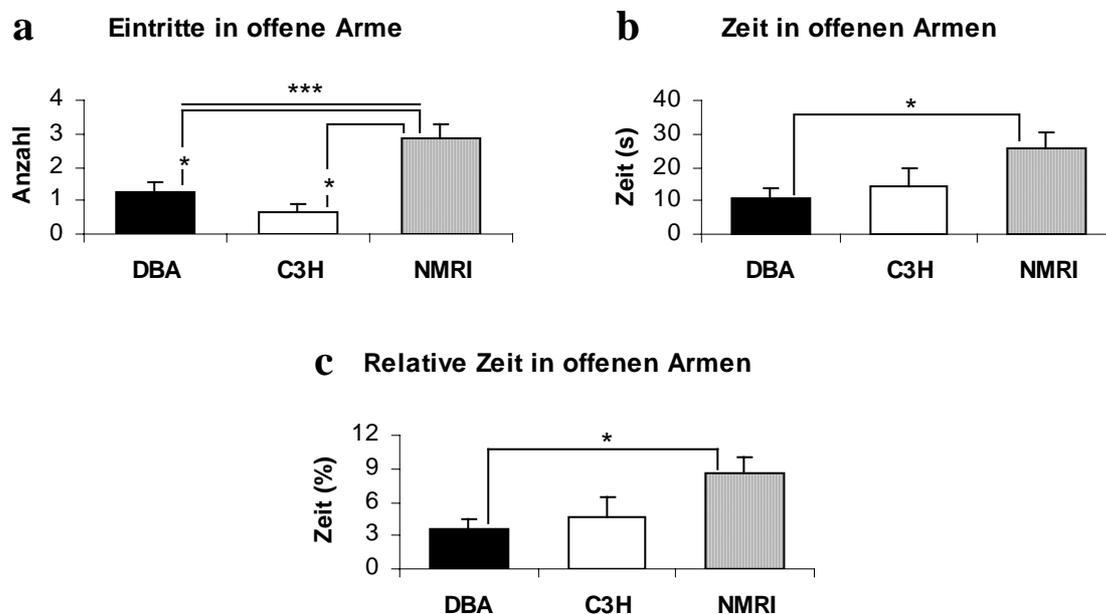


Abb.11. Verhalten der Mäusestämme C3H/HeN, DBA/2J und NMRI auf dem EPM.

Auf dem EPM zeigten NMRI-Mäuse mehr Eintritte in die offenen Arme als die anderen beiden Stämme (a). Die durchschnittlich verbrachte Zeit auf den offenen Armen (b) und die relative verbrachte Zeit auf den offenen Armen (c) war bei NMRI-Mäusen höher als bei DBA-Mäusen.

\* =  $p < 0,05-0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

### c) Furcht-sensitivierte akustische Schreckreaktion (ASR)

In der Furcht-sensitiven ASR zeigte die ein-faktorielle ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen in den Amplituden der Schreckreaktion [ $F = 36,55$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 1-2;  $F = 33,14$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 3-4 und  $F = 35,70$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 5-7]. Anschließend post-hoc Tests zeigten, dass DBA-Mäuse eine geringere Amplitude der

Schreckreaktion aufwiesen als die anderen beiden Stämme, wohingegen sich C3H- und NMRI-Mäuse nicht signifikant in ihren Amplituden unterschieden (Ausnahme: Block 5) (Abb.12a).

Auch zeigte die ANOVA, dass die Unterschiede zwischen den Stämmen in der „sofortigen“ Sensitivierung der ASR (B5 minus B4) die Signifikanzschwelle nicht erreichten [ $F = 2,63$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,08$ ], während die „gesamte“ Sensitivierung dieses Reflexes nach den Fußschocks (B 5-7 minus B 3-4) sich signifikant zwischen den Stämmen unterschied [ $F = 6,94$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ]. Hier wiesen DBA-Mäuse eine geringere Sensitivierung auf als C3H-Mäuse (Abb.12b), wie anschließende Tukey-Tests zeigten.

Für Einzelergebnisse des ANOVAs und der post-hoc Tests siehe Anhang Tab.1.

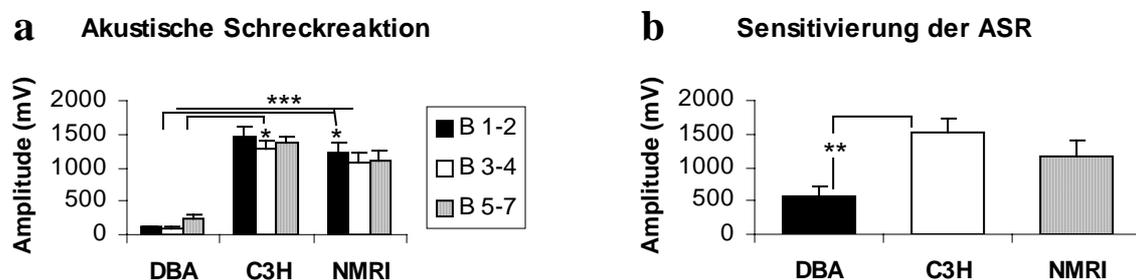


Abb.12. Verhalten der Mäusestämme C3H/HeN, DBA/2J und NMRI in der Furcht-sensitvierten ASR. DBA-Mäuse wiesen eine niedrigere Amplitude der ASR auf als C3H- und NMRI-Mäuse, welche sich in diesem Parameter nicht signifikant unterschieden (a). Weiterhin zeigten DBA-Mäuse eine geringere „gesamte“ Sensitivierung dieses Reflexes (B 5-7 minus B 3-4) im Vergleich zu C3H-Mäusen (b).

\*\* =  $p < 0,01-0,001$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

## 2. Effekt der Transferprozedur

Die Prozedur des Embryotransfers an sich könnte einen Einfluss auf das Verhalten des adulten Nachwuchses haben. Ein solcher Transfereffekt wurde durch den Vergleich der unbehandelten Kontrolltiere eines jeden Stammes mit der entsprechenden isogenen Transfergruppe untersucht (z.B. Vergleich der NMRI-Kontrolltiere mit der Transfergruppe NMRI in NMRI). Die Mäuse dieser Gruppen hatten denselben genetischen Hintergrund und dieselbe uterine und postnatale Umwelt, aber die Tiere der isogenen Transfergruppen wurden einem Embryotransfer unterzogen.

Der t-Test zeigte einen signifikanten Transfereffekt beim Inzuchtstamm C3H in der durchschnittlich mit Aufrichtungen verbrachten Zeit in der Motilitätsbox [ $t = 2,67$ ,  $df = 33,4$ ,  $p = 0,01$ ]. Die Tiere des isogenen Transfers dieses Stammes richteten sich häufiger auf als die unbehandelten Kontrolltiere (Abb.13a). Dieser Effekt war in den ersten 5 Minuten des Tests

signifikant [ $t = 2,55$ ,  $df = 28,9$ ,  $p = 0,02$ ], in der zweiten Testhälfte lag er an der Signifikanzgrenze [ $t = 2,01$ ,  $df = 32,9$ ,  $p = 0,05$ ].

Beim Inzuchtstamm DBA konnten keine signifikanten Effekte der Transferprozedur auf die untersuchten Verhaltensparameter der drei Tests gefunden werden.

Im Gegensatz dazu zeigte der durchgeführte t-Test beim Auszuchtstamm NMRI eine Vielzahl von Transfereffekten in der Motilitätsbox und der Furcht-sensitiven ASR. In der Motilitätsbox führte die Prozedur des Embryotransfers zu einer signifikant geringeren Zeit, welche die Mäuse im Zentrum der Box verbrachten [ $t = -2,13$ ,  $df = 30,7$ ,  $p = 0,04$ ], was auf eine höhere Ängstlichkeit dieser Tiere schließen ließ (Abb.13b). Die etwas geringere horizontale Exploration des isogenen Transfers [ $t = -1,72$ ,  $df = 26,5$ ,  $p < 0,1$ ] und die etwas höhere Anzahl von Aufrichtungen [ $t = 1,96$ ,  $df = 28,4$ ,  $p = 0,06$ ] erreichten nicht die Signifikanzgrenze.

In der Furcht-sensitiven ASR zeigte der durchgeführte t-Test beim isogenen Transfer des Stammes NMRI eine signifikant geringere Amplitude der Schreckreaktion bei fast allen Blöcken im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren [ $t = -5,04$ ,  $df = 17,3$ ,  $p < 0,001$  für B 1-2;  $t = -5,19$ ,  $df = 17,7$ ,  $p < 0,001$  für B 3-4 und  $t = -3,50$ ,  $df = 24,9$ ,  $p < 0,01$  für B 5-7] (Abb.13c). Einzig in Block 5 erreichten die Unterschiede nicht die Signifikanzschwelle. Zusätzlich zeigten die isogenen Transfertiere dieses Stammes eine signifikant höhere „sofortige“ Sensitivierung dieses Reflexes (B 5 minus B 4) verglichen mit den unbehandelten Kontrollen [ $t = 2,99$ ,  $df = 29$ ,  $p < 0,01$ ], was wiederum auf ein höheres Angstverhalten der transferierten Tiere hinwies (Abb.13d).

Für detaillierte Einzelergebnisse siehe Anhang Tab.2 und Tab.3.

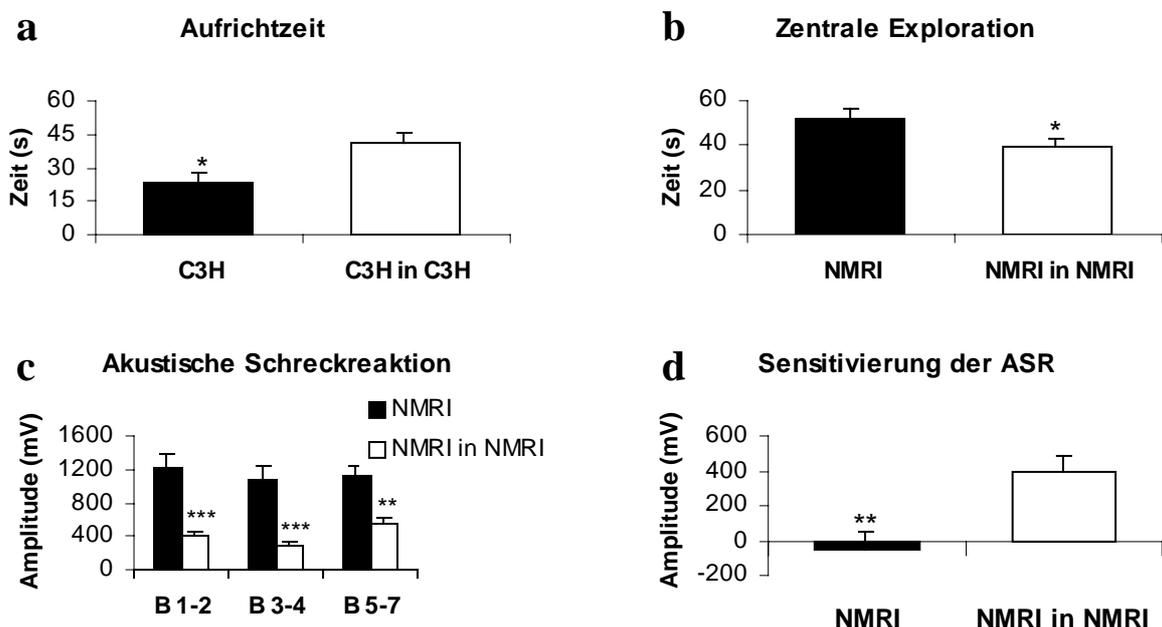


Abb.13. Effekte der Prozedur des Embryotransfers auf Verhaltensparameter von C3H- und NMRI-Mäusen. Bei C3H-Mäusen zeigte der isogene Transfer einen signifikanten Anstieg in der mit Aufrichtungen verbrachten Zeit in der Motilitätsbox (a). Der isogene Transfer des NMRI-Stammes zeigte eine signifikante Reduktion bei der im Zentrum der Motilitätsbox verbrachten Zeit (b). Weiterhin führte der isogene Transfer von NMRI-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Amplitude der ASR (c) und einem Anstieg der „sofortigen“ Sensitivierung dieses Reflexes (d).

\* =  $p < 0,05$ - $0,01$ ; \*\* =  $p < 0,01$ - $0,001$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

### **3. Vergleich der isogenen Transfers der drei Stämme**

Aufgrund der Effekte des Embryotransfers an sich, zeigten die isogenen Transfers der drei Mäusestämme (C3H in C3H, DBA in DBA und NMRI in NMRI) nun andere Verhaltensunterschiede in den durchgeführten Tests als die unbehandelten Kontrolltiere.

#### a) Motilitätsbox

Die ein-faktorielle ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den isogenen Transfers der drei Stämme in ihrer mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit [ $F = 9,69$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ]. Jedoch erreichten die Unterschiede in der zweiten Versuchshälfte nicht mehr die Signifikanzschwelle [ $F = 2,85$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,07$ ] und die nachfolgenden Tukey-Tests zeigten, dass sich nur die isogenen Transfers der Stämme C3H und NMRI in diesem Parameter unterschieden, wobei NMRI-Mäuse eine höhere Aktivität aufwiesen (Abb.14a). Die signifikanten Unterschiede der drei Stämme beim zurückgelegten Weg hatten sich durch die Transferprozedur nicht verändert [ $F = 32,25$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] (Abb.14b). Die Anzahl der Aufrichtungen [ $F = 46,43$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] und die mit Aufrichtungen verbrachte Zeit [ $F = 48,94$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] waren weiterhin signifikant unterschiedlich zwischen den isogenen Transfergruppen, jedoch zeigten die post-hoc Tests keine Unterschiede zwischen den isogenen Transfers der Stämme C3H und DBA (Abb.14c,d).

Der Unterschied zwischen unbehandelten C3H- und DBA-Mäusen in der im Zentrum der Box verbrachten Zeit in den ersten 5 Minuten des Tests konnte nach der Transferprozedur nicht mehr gefunden werden, sodass sich die drei isogenen Transfergruppen in diesem Verhaltenstest nicht in ihrem Angstverhalten unterschieden.

#### b) Elevated Plus-Maze

Die ein-faktorielle ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied der isogenen Transfergruppen in der Anzahl der Eintritte in die offenen Arme des EPM [ $F = 10,32$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], jedoch konnte in den nachfolgenden Tukey-Tests kein Unterschied zwischen den

isogenen Transfers der Stämme DBA und NMRI festgestellt werden (Abb.14e). Auch unterschieden sich die Gruppen signifikant in der Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme [ $F = 34,09$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] und das Zentrum [ $F = 37,57$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] des Maze. Anschließende post-hoc Tests zeigten jedoch, dass sich nun auch die isogenen Transfergruppen der Stämme C3H und DBA unterschieden, wobei DBA-Mäuse mehr Eintritte in diese Kompartimente aufwiesen als C3H-Mäuse (Abb.14f). Die Unterschiede der isogenen Transfergruppen in der verbrachten Zeit im Zentrum des Maze [ $F = 3,54$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,04$ ] hatten sich durch die Transferprozedur nicht verändert, die Unterschiede in der verbrachten Zeit in den geschlossenen Armen erreichten nun die Signifikanzgrenze nicht mehr [ $F = 3,00$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,06$ ].

Nach der Prozedur des Embryotransfers unterschieden sich die Stämme nicht mehr signifikant in der absoluten und relativen verbrachten Zeit in den offenen Armen des Maze, es existierten also keine Unterschiede im Angstverhalten mehr.

#### c) Furcht-sensitivierte ASR

Die ein-faktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede der isogenen Transfergruppen der drei Stämme in den Amplituden der ASR [ $F = 27,60$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 1-2;  $F = 28,27$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 3-4 und  $F = 14,21$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 5-7]. Nachfolgende Tukey-Tests ergaben jedoch, dass der isogene Transfer des Stammes C3H eine höhere Schreckhaftigkeit aufwies als die isogenen Transfers der anderen beiden Stämme, wohingegen diese sich nicht signifikant in ihren Amplituden unterschieden (Abb.14g).

Nach der Prozedur des Embryotransfers existierte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Stämmen C3H und DBA in der „gesamten“ Sensitivierung (B 5-7 minus B 3-4), die isogenen Transfers der drei Stämme unterschieden sich also auch in diesem Verhaltenstest nicht in ihrem Angstverhalten.

Für detaillierte Einzelergebnisse siehe Anhang Tab.4.

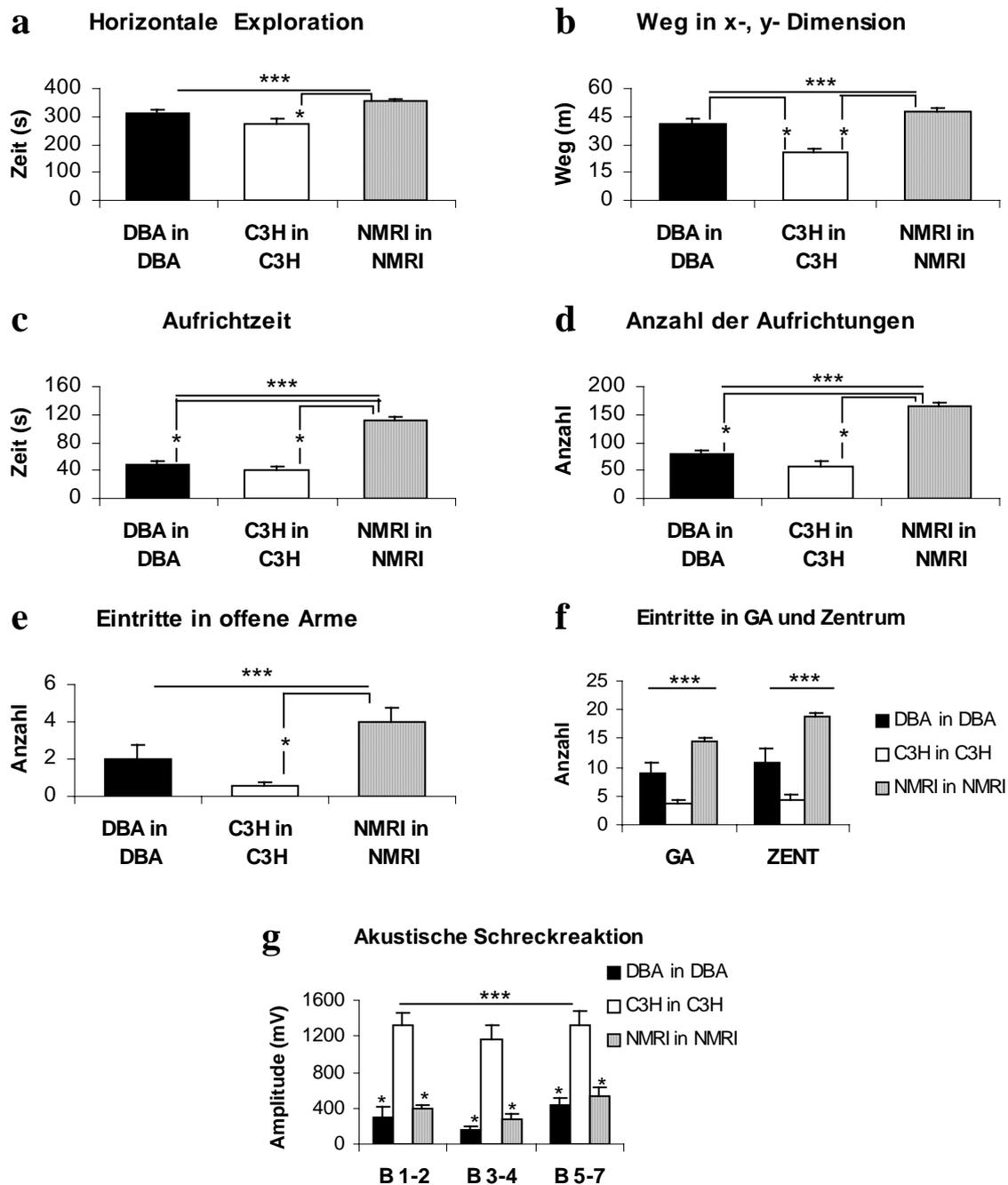


Abb.14. Verhaltensunterschiede zwischen den isogenen Transfers der Stämme DBA/2J, C3H/HeN und NMRI in der Motilitätsbox, auf dem EPM und in der Furcht-sensitiven ASR.

In der Motilitätsbox unterschieden sich nur die isogenen Transfers der Stämme C3H und NMRI in ihrer durchschnittlich mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit (a). Es existierten keine Unterschiede zu den unbehandelten Tieren im durchschnittlich zurückgelegten Weg in der Box (b). Die isogenen Transfers der Stämme C3H und DBA unterschieden sich nicht mehr in ihrer durchschnittlich mit Aufrichtungen verbrachten Zeit (c) und ihrer durchschnittlichen Anzahl von Aufrichtungen (d). Im EPM unterschieden sich die isogenen Transfers der Stämme DBA und NMRI nicht mehr signifikant in ihrer durchschnittlichen Anzahl von Eintritten in die offenen Arme (e). Bei der durchschnittlichen Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme und das Zentrum des Maze unterschieden sich nach der Transferprozedur auch die Stämme C3H und DBA (f). In der ASR unterschieden sich die isogenen Transfers der Stämme NMRI und DBA nicht mehr signifikant in ihrer Amplitude, jedoch zeigte nun der isogene Transfer des NMRI-Stammes eine geringere Amplitude als der isogene Transfer des C3H-Stammes (g). \*\*\* =  $p < 0,001$

#### **4. Wechselseitiger Transfer der drei Ausgangsstämme**

Durch die reziproken Embryotransfers zwischen den drei Mäusestämmen wurden neun Transfergruppen erhalten, welche wiederum in den drei Verhaltenstests untersucht wurden (Tab.8).

Transfergruppen	Anzahl getesteter Nachkommen		
	Motilitätsbox	Elevated Plus-Maze	Furcht-sensitivierte ASR
C3H in C3H	18	17	17
C3H in DBA	17	17	17
C3H in NMRI	15	17	17
DBA in DBA	9	8	9
DBA in C3H	17	16	17
DBA in NMRI	17	17	17
NMRI in NMRI	17	17	15
NMRI in C3H	17	17	17
NMRI in DBA	17	16	17

Tab.8. Transfergruppen und Anzahl der getesteten Nachkommen pro Transfergruppe in den drei Verhaltenstests.

#### **4.1 Drei-faktorielle Varianzanalyse**

Zur allgemeinen Übersicht wurde mit den Ergebnissen der Verhaltensuntersuchungen der Nachkommen der reziproken Transfergruppen eine drei-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Embryo-Donatoren (genetische Effekte), Embryo-Rezipienten (maternale Effekte) und Geschlecht berechnet (Tab.9).

##### a) genetische Effekte

Die Analyse zeigte einen signifikanten Effekt des genetischen Hintergrundes der transferierten Embryonen auf alle untersuchten Parametern der Motilitätsbox [ $F = 44,37$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die mit horizontaler Exploration verbrachte Zeit;  $F = 89,27$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für den zurückgelegten Weg;  $F = 159,47$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Aufrichtungen;  $F = 146,56$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die mit Aufrichtungen verbrachte Zeit und  $F = 3,09$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,05$  für die im Zentrum verbrachte Zeit]. Die Verweildauer der Tiere im Zentrum der Box als ein Indikator des Angstverhaltens war nur in den ersten 5 Minuten des Tests und über die gesamte Testzeit hinweg signifikant abhängig von der genetischen Herkunft der Embryonen, nicht jedoch in der zweiten Testhälfte.

Auf dem EPM war die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Kompartimente des Maze

[ $F = 26,76$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme;  $F = 55,96$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme und  $F = 61,06$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die zentrale Plattform], die verbrachte Zeit in den geschlossenen Armen [ $F = 10,91$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] und in der zentralen Plattform [ $F = 16,71$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], sowie der Quotient (verbrachte Zeit in offenen Armen/verbrachte Zeit in geschlossenen Armen) [ $F = 3,48$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,03$ ] signifikant von der genetischen Abstammung der transferierten Embryonen abhängig. Jedoch erreichte der genetische Einfluss auf die verbrachte Zeit in den offenen Armen des Maze nicht die Signifikanzschwelle [ $F = 2,35$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ], ebenso war die relative Zeit in den offenen Armen nicht signifikant von genetischen Faktoren abhängig.

In der ASR wurde die Amplitude aller Blöcke signifikant von genetischen Faktoren beeinflusst [ $F = 88,34$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 1-2;  $F = 85,94$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 3-4 und  $F = 47,36$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 5-7], wie auch die „sofortige“ und die „gesamte“ Sensitivierung dieses Reflexes [ $F = 7,34$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die „sofortige“ Sensitivierung und  $F = 6,34$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die „gesamte“ Sensitivierung].

#### b) maternale Effekte

Ein signifikanter Einfluss des genetischen Hintergrundes der Rezipienten wurde in der Motilitätsbox bei der Anzahl der Aufrichtungen [ $F = 8,95$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] und der mit Aufrichtungen verbrachten Zeit [ $F = 12,89$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] gefunden. Weiterhin existierte ein signifikanter maternaler Einfluss auf den zurückgelegten Weg in der Motilitätsbox, allerdings nur in den ersten 5 Minuten des Tests [ $F = 3,12$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,05$ ].

Auf dem EPM hatte die genetische Herkunft der Rezipienten keinen signifikanten Effekt auf das Verhalten des transferierten Nachwuchses.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Furcht-sensitivierten ASR ein signifikanter Einfluss des genetischen Hintergrundes der Rezipienten auf die Amplituden aller Blöcke [ $F = 5,50$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für B 1-2;  $F = 6,56$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für B 3-4 und  $F = 7,37$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 5-7]. Der maternale Einfluss auf die „gesamte“ Sensitivierung dieses Reflexes durch die Fußschocks erreichte nicht die Signifikanzgrenze [ $F = 2,94$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,06$ ].

#### c) Wechselwirkungen zwischen genetischen und maternalen Effekten

In der Motilitätsbox wurde eine signifikante Wechselwirkung zwischen der genetischen Herkunft der Donatoren und derjenigen der Rezipienten bei der mit horizontaler Exploration

verbrachten Zeit [ $F = 2,65$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,04$ ] und dem zurückgelegten Weg [ $F = 2,64$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,04$ ] in den ersten 5 Minuten des Tests festgestellt, über die gesamte Testzeit hinweg betrachtet lagen diese Wechselwirkungen an der Signifikanzgrenze [ $F = 2,42$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,05$  für die mit horizontaler Exploration verbrachte Zeit und  $F = 2,40$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,05$  für den zurückgelegten Weg].

Auf dem EPM zeigte sich eine solche Wechselwirkung bei der Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme [ $F = 3,51$ ,  $df = 4$ ,  $p < 0,01$ ] und die zentrale Plattform [ $F = 2,92$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,02$ ] des Maze, wie auch bei der auf der zentralen Plattform verbrachten Zeit [ $F = 2,83$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,03$ ].

Bei der Furcht-sensitvierten ASR konnten keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen genetischen und maternalen Faktoren festgestellt werden.

#### d) Geschlecht

In der Motilitätsbox wurde ein signifikanter Einfluss des Geschlechtes der untersuchten Tiere auf die horizontale Aktivität in den letzten 5 Minuten des Tests festgestellt [ $F = 4,41$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,04$ ], jedoch war dieser über die gesamte Testzeit hinweg betrachtet nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der ASR ein signifikanter Einfluss des Geschlechtes der Tiere auf ihre Schreckhaftigkeit in allen Blöcken, wobei Männchen eine höhere Amplitude der Schreckreaktion aufwiesen [ $F = 10,95$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,01$  für B 1-2;  $F = 7,22$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,01$  für B 3-4 und  $F = 6,13$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,02$  für B 5-7].

#### e) Wechselwirkung zwischen genetischen Effekten und Geschlecht

Eine signifikante Wechselwirkung zwischen der genetischen Abstammung der Embryo-Donatoren und dem Geschlecht des Nachwuchses wurde in der ASR bei Block 1-2 [ $F = 3,10$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,05$ ] und Block 3-4 [ $F = 3,45$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,04$ ] gefunden.

#### f) Wechselwirkungen zwischen maternalen Effekten und Geschlecht

Wechselwirkungen zwischen dem genetischen Hintergrund der Rezipienten und dem Geschlecht des Nachwuchses wurden nur in der Motilitätsbox bei der Verweildauer der Tiere im Zentrum der Box [ $F = 3,90$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$ ] sowie bei der Anzahl der Aufrichtungen in den ersten 5 Minuten des Tests [ $F = 3,60$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,03$ ] festgestellt.

Variable	Geschlecht df = 1	Donatoren df = 2	Rezipienten df = 2	Donatoren × Rezipienten df = 4	Donatoren × Geschlecht df = 2	Rezipienten × Geschlecht df = 2
Motilitätsbox						
Horizontale Exploration	F=1,71 p > 0,1	F=44,37 p < 0,001	F=0,30 p > 0,1	F=2,42 p = 0,05	F=1,50 p > 0,1	F=0,41 p > 0,1
Weg	F=0,10 p > 0,1	F=89,27 p < 0,001	F=2,20 p > 0,1	F=2,40 p = 0,05	F=1,26 p > 0,1	F=0,24 p > 0,1
Aufrichtzeit	F=0,01 p > 0,1	F=146,56 p < 0,001	F=12,89 p < 0,001	F=0,54 p > 0,1	F=0,97 p > 0,1	F=0,41 p > 0,1
Zahl Aufrichtung	F=0,42 p > 0,1	F=159,47 p < 0,001	F=8,95 p < 0,001	F=1,13 p > 0,1	F=2,69 p = 0,07	F=1,40 p > 0,1
Zentrale Exploration	F=0,41 p > 0,1	F=3,09 p < 0,05	F=1,29 p > 0,1	F=0,93 p > 0,1	F=1,08 p > 0,1	F=3,90 p = 0,02
<b>EPM</b>						
Eintritte in OA	F=0,22 p > 0,1	F=26,76 p < 0,001	F=0,03 p > 0,1	F=0,75 p > 0,1	F=0,38 p > 0,1	F=1,01 p > 0,1
Zeit in OA	F=1,53 p > 0,1	F=2,35 p < 0,1	F=0,39 p > 0,1	F=0,20 p > 0,1	F=1,34 p > 0,1	F=1,35 p > 0,1
Relative Zeit OA	F=1,58 p > 0,1	F=2,22 p > 0,1	F=0,40 p > 0,1	F=0,20 p > 0,1	F=1,27 p > 0,1	F=1,35 p > 0,1
OA/OA+GA	F=1,33 p > 0,1	F=3,48 p = 0,03	F=0,29 p > 0,1	F=0,16 p > 0,1	F=0,99 p > 0,1	F=1,30 p > 0,1
<b>ASR</b>						
B1+B2/2	F=10,95 p < 0,01	F=88,34 p < 0,001	F=5,50 p < 0,01	F=2,04 p = 0,09	F=3,10 p < 0,05	F=1,01 p > 0,1
B3+B4/2	F=7,22 p < 0,01	F=85,94 p < 0,001	F=6,56 p < 0,01	F=1,20 p > 0,1	F=3,45 p = 0,04	F=0,32 p > 0,1
B5+B6+B7/3	F=6,13 p = 0,02	F=47,36 p < 0,001	F=7,37 p < 0,001	F=1,39 p > 0,1	F=1,18 p > 0,1	F=1,30 p > 0,1
B5 - B4	F=0,13 p > 0,1	F=7,34 p < 0,01	F=0,38 p > 0,1	F=1,38 p > 0,1	F=1,11 p > 0,1	F=0,47 p > 0,1
(B5-7) – (B3-4)	F=1,42 p > 0,1	F=6,34 p < 0,01	F=2,94 p = 0,06	F=1,70 p > 0,1	F=0,01 p > 0,1	F=1,55 p > 0,1

Tab.9. Drei-faktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Embryo-Donatoren, Embryo-Rezipienten und Geschlecht für die untersuchten Verhaltensparameter der Nachkommen der Transfergruppen in den drei Verhaltenstests. Für detaillierte Ergebnisse siehe Anhang Tab. 5a und b.

OA = offene Arme des EPM

GA = geschlossene Arme des EPM

df = Anzahl der Freiheitsgrade

rot = signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ )

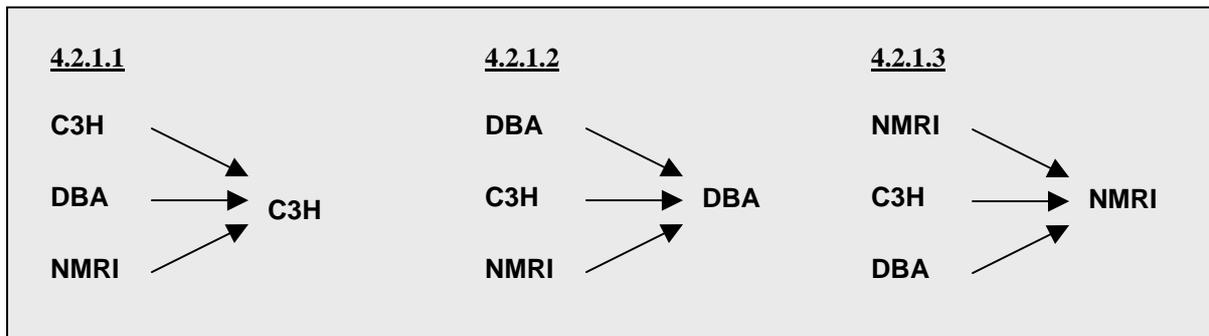
gelb = p-Werte nahe der Signifikanzgrenze ( $p = 0,05$  bis  $p < 0,1$ )

## 4.2 Ergebnisse der einzelnen Transfergruppen

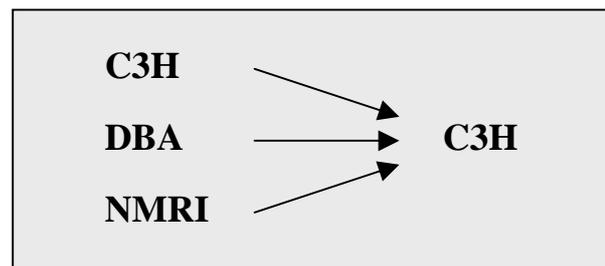
Diejenigen Verhaltensparameter, welche signifikante Effekte oder Effekte nahe der Signifikanzschwelle in der drei-faktoriellen ANOVA aufwiesen, wurden zur weiteren Charakterisierung mittels ein-faktoriellen ANOVAs und nachfolgenden Tukey-Tests untersucht.

#### 4.2.1 Bestimmung von genetischen Einflüssen

Genetische Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen wurden durch den Vergleich der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in Leihmütter des selben Stammes ermittelt. Dies wurde für Leihmütter aller drei Mäusestämme durchgeführt.



##### 4.2.1.1. Transfer von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in C3H-Rezipienten



Durch den Vergleich der Transfergruppen C3H in C3H, DBA in C3H und NMRI in C3H wurden genetische Einflüsse auf das Verhalten des Nachwuchses von C3H-Leihmüttern untersucht, da Embryonen unterschiedlicher genetischer Herkunft in genetisch identische Rezipienten transferiert wurden. Genetische Einflüsse auf die Verhaltensparameter des Nachwuchses wurden in allen drei Verhaltenstests gefunden (Tab.10).

In der Motilitätsbox zeigte die ein-faktorielle ANOVA signifikante Effekte der genetischen Herkunft der transferierten Embryonen auf alle untersuchten Verhaltensparameter [F = 11,42, df = 2, p < 0,001 für die mit horizontaler Exploration verbrachte Zeit; F = 32,11, df = 2, p < 0,001 für den zurückgelegten Weg; F = 60,90, df = 2, p < 0,001 für die mit Aufrichtungen verbrachte Zeit; F = 53,71, df = 2, p < 0,001 für die Anzahl der Aufrichtungen und F = 6,15, df = 2, p < 0,01 für die Verweildauer im Zentrum der Box].

Anschließend post-hoc Tests ergaben, dass der Transfer von NMRI- und DBA-Blastozysten

in C3H-Leihmütter zu längeren Laufzeiten, einem längeren zurückgelegten Weg und einem höheren Aufrichtverhalten des Nachwuchses führte im Vergleich zur isogenen Transfergruppe. Die Nachkommen von NMRI- und DBA-Blastozysten unterschieden sich nicht signifikant in der mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit und dem zurückgelegten Weg, jedoch zeigten NMRI-Mäuse ein höheres Aufrichtverhalten als DBA-Mäuse. Weiterhin führte der Transfer von NMRI-Blastozysten in C3H-Rezipienten zu einer längeren Verweildauer der Nachkommen im Zentrum der Box im Vergleich zum Transfer von DBA- und C3H-Blastozysten (Abb.15a).

Auf dem EPM zeigte die ANOVA nur signifikante Unterschiede zwischen den drei Transfergruppen in der Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Kompartimente des Maze [ $F = 6,49$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme;  $F = 16,89$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme und  $F = 16,09$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die zentrale Plattform des Maze]. Die absolute und relative Zeit, welche in den verschiedenen Kompartimenten des Maze verbracht wurde, sowie der Quotient (verbrachte Zeit in offenen Armen/verbrachte Zeit in geschlossenen Armen) unterschieden sich nicht signifikant zwischen dem Nachwuchs von C3H-, DBA- und NMRI-Blastozysten.

Anschließend post-hoc Tests ergaben, dass der Transfer von NMRI-Blastozysten in C3H-Rezipienten zu einer höheren Anzahl von Eintritten in die offenen Arme des Maze führte im Vergleich zum Transfer von DBA-Blastozysten und dem isogenen Transfer. Auch zeigten Nachkommen des Transfers von NMRI- oder DBA-Blastozysten in C3H-Rezipienten eine höhere Anzahl von Eintritten in die geschlossenen Arme und die zentrale Plattform des Maze verglichen mit dem isogenen Transfer (Abb.15b).

In der Furcht-sensitvierten ASR unterschieden sich fast alle untersuchten Parameter signifikant zwischen den Transfergruppen [ $F = 23,59$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 1-2;  $F = 24,50$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 3-4;  $F = 17,85$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 5-7 und  $F = 3,87$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,03$  für die „gesamte“ Sensitivierung], nur bei der „sofortigen“ Sensitivierung der ASR zeigte die ein-faktorielle ANOVA keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Nachfolgende Tukey-Tests ergaben, dass der Transfer von DBA-Blastozysten in C3H-Rezipienten zu einer geringeren Amplitude der ASR bei den Nachkommen führte verglichen mit dem Transfer von NMRI- oder C3H-Blastozysten. Die Nachkommen von C3H-Blastozysten wiesen nur im mittleren Block (B 3-4) eine höhere Amplitude als die Nachkommen von NMRI-Blastozysten auf. Weiterhin zeigten die Nachkommen von DBA-Blastozysten eine signifikant niedrigere „gesamte“ Sensitivierung der ASR im Vergleich zum Nachwuchs von C3H- Blastozysten (Abb.15c).

## Transfer in C3H versus unbehandelte Tiere

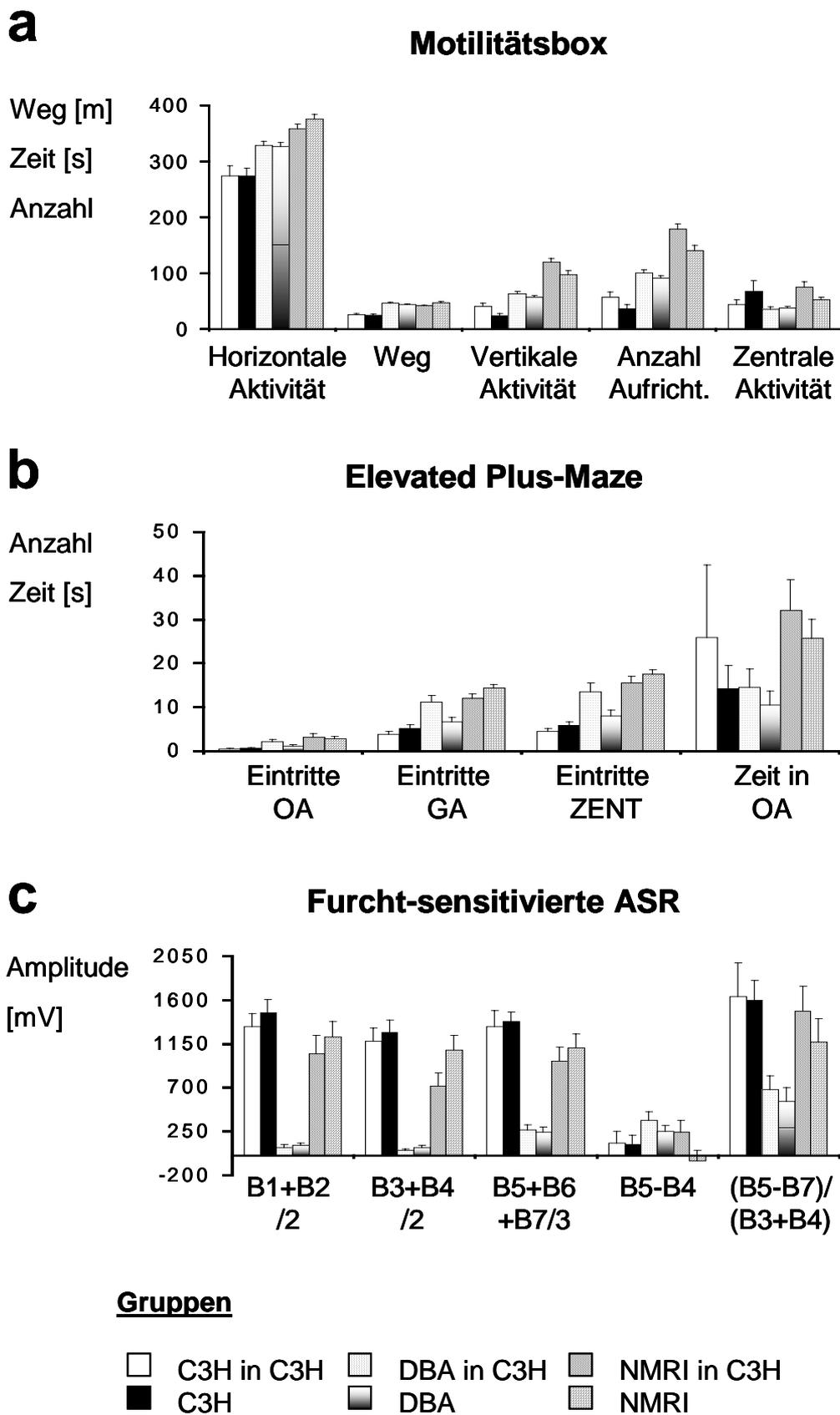


Abb.15

Abb.15. Genetische Einflüsse beim Transfer von Blastozysten in C3H-Rezipienten.

Die genetischen Effekte wurden analysiert durch den Vergleich des Verhalten des Nachwuchses von genetisch unterschiedlichen Blastozysten (C3H, DBA und NMRI), welche in C3H-Leihmütter transferiert wurden. Hier wurde das Verhalten des resultierenden Nachwuchses a) in der Motilitätsbox b) auf dem EPM und c) in der Furcht-sensitiven ASR verglichen mit dem Verhalten der unbehandelten Tiere. Verhaltensmessungen wurden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. Die horizontale, vertikale und zentrale Aktivität in der Motilitätsbox sowie die in den offenen Armen des EPM verbrachte Zeit wurde in Sekunden dargestellt. Auch die Anzahl von Aufrichtungen/Anlehnungen an die Wände in der Motilitätsbox sowie die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Kompartimente des EPM wurden dargestellt, ebenso wie die Amplitude der Schreckreaktion und die „sofortige“ (B5-B4) und „gesamte“ (B5-B7)/(B3+B4) Sensitivierung der ASR, welche in mV gemessen wurden.

OA = offene Arme des EPM

GA = geschlossene Arme des EPM

ZENT = zentrale Plattform des EPM

Für Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der untersuchten Parameter der Nachkommen der reziproken Transfergruppen siehe Anhang Tab.6.

Variable	ANOVA und Tukey-Tests der Transfers				
	CC - DC - NC		Tukey-Tests		
	F-Werte	p-Werte	CC-DC	CC-NC	DC-NC
<b>Motilitätsbox</b>					
Horizont. Exploration	<b>11,42</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	-
Weg	<b>32,11</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	-
Aufrichtzeit	<b>60,90</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
Zahl Aufrichtungen	<b>53,71</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
Zentrale Exploration	<b>6,15</b>	<b>&lt; 0,01</b>	-	+	+
<b>Elevated Plus-Maze</b>					
Eintritte in OA	<b>6,49</b>	<b>&lt; 0,01</b>	-	+	-
Zeit in OA	0,70	> 0,1			
Relative Zeit OA	0,59	> 0,1			
OA/OA+CA	0,74	> 0,1			
<b>Akustische Schreckreaktion</b>					
B1+B2/2	<b>23,59</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	-	+
B3+B4/2	<b>24,50</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
B5+B6+B7/3	<b>17,85</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	-	+
B5 - B4	1,10	> 0,1			
(B5-7) - (B3-4)	<b>3,87</b>	<b>0,03</b>	+	-	-

Tab.10. ANOVA und Tukey-Tests der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in C3H-Leihmütter. Signifikante F- und p-Werte wurden fett dargestellt.

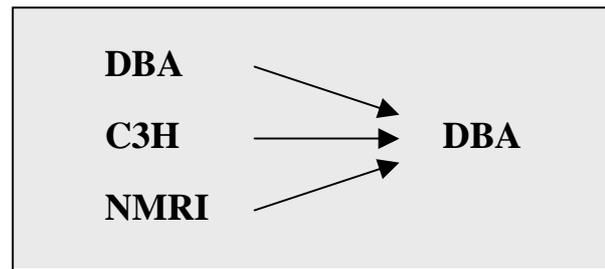
Anzahl der Freiheitsgrade df = 2

OA = offene Arme des EPM

GA = geschlossene Arme des EPM

für Details siehe Anhang Tab.7

#### 4.2.1.2 Transfer von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in DBA-Rezipienten



Genetische Einflüsse auf das Verhalten des adulten Nachwuchses von DBA-Leihmüttern wurden durch den Vergleich der Transfergruppen DBA in DBA, C3H in DBA und NMRI in DBA untersucht. Auch hier wurden wieder Unterschiede zwischen den Transfergruppen in allen Verhaltenstests gefunden (Tab.11).

In der Motilitätsbox zeigte der Nachwuchs der drei Transfergruppen signifikante Unterschiede in der mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit [ $F = 31,29$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], dem zurückgelegten Weg [ $F = 36,49$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], der mit Aufrichtungen verbrachten Zeit [ $F = 50,89$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] und der Anzahl der Aufrichtungen [ $F = 69,72$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], was durch eine ein-faktorielle ANOVA gezeigt wurde. Jedoch existierten keine signifikanten genetischen Effekte auf die Verweildauer der Tiere im Zentrum der Box. Nachfolgende Tukey-Tests ergaben, dass der Transfer von NMRI-Blastozysten in DBA-Leihmütter zu einer längeren mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit bei den Nachkommen führte im Vergleich zu Nachkommen des isogenen Transfers und des Transfers von C3H-Blastozysten, welche sich in diesem Parameter nicht unterschieden. Weiterhin führte der Transfer von NMRI- und DBA-Blastozysten in DBA-Rezipienten zu einem längeren zurückgelegten Weg der Nachkommen verglichen mit dem Transfer von C3H-Embryonen. Beim Aufrichtverhalten unterschieden sich alle drei Transfergruppen signifikant voneinander, wobei der Transfer von C3H-Blastozysten zu einem niedrigeren Aufrichtverhalten der Nachkommen im Vergleich zum isogenen Transfer führte, der Transfer von NMRI-Blastozysten hingegen zu einem höheren Aufrichtverhalten (Abb.16a).

Auf dem EPM zeigte die ANOVA signifikante Einflüsse des genetischen Hintergrundes der Blastozysten auf die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Kompartimente [ $F = 8,00$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme;  $F = 30,29$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme und  $F = 29,50$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl der Eintritte in die zentrale Plattform des Maze]. Die Nachkommen der drei Transfergruppen unterschieden sich auch signifikant in der in den geschlossenen Armen

[ $F = 4,27$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$ ] und der zentralen Plattform [ $F = 14,70$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] verbrachten Zeit. Die absolute und relative in den offenen Armen verbrachte Zeit und der Quotient (verbrachte Zeit in offenen Armen/verbrachte Zeit in geschlossenen Armen) waren jedoch nicht von der genetischen Herkunft der Blastozysten abhängig.

Nachfolgende post-hoc Tests ergaben, dass der Transfer von NMRI-Blastozysten in DBA-Leihmütter bei den Nachkommen zu einer höheren Anzahl von Eintritten in die offenen Arme des Maze führte als der Transfer von C3H-Blastozysten. Der Transfer von C3H-Embryonen führte bei den Nachkommen zu weniger Eintritten in die geschlossenen Arme und die zentrale Plattform des Maze als der isogene Transfer, im Gegensatz dazu führte der Transfer von NMRI-Blastozysten zu einer höheren Anzahl von Eintritten in diese Kompartimente (Abb.16b). Auch führte der Transfer von NMRI-Blastozysten in DBA-Leihmütter bei den Nachkommen sowohl zu einer signifikant geringeren verbrachten Zeit in den geschlossenen Armen als auch zu einer höheren verbrachten Zeit im Zentrum des Maze im Vergleich zum isogenen Transfer. Die Nachkommen von NMRI- und C3H-Blastozysten unterschieden sich nur in der im Zentrum des Maze verbrachten Zeit, wobei der Transfer von NMRI-Blastozysten zu einem längeren Aufenthalt bei den Nachkommen führte.

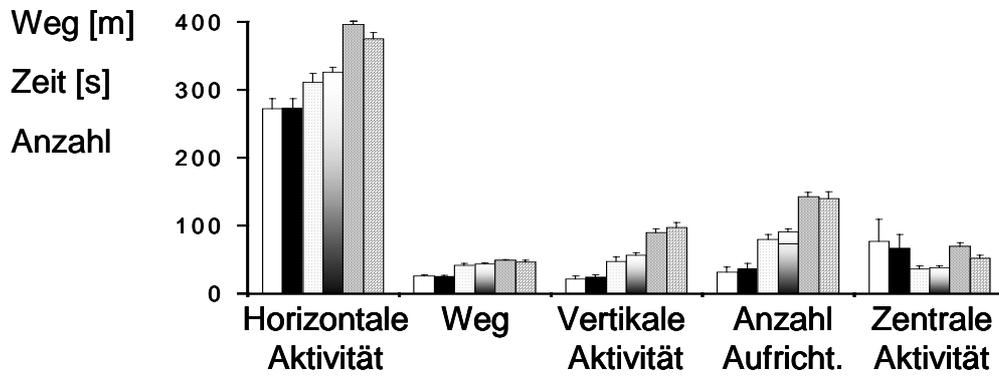
In der Furcht-sensitivierten ASR unterschieden sich die Nachkommen der drei Transfergruppen signifikant in allen untersuchten Parametern [ $F = 20,66$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 1-2;  $F = 25,04$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 3-4;  $F = 10,58$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 5-7;  $F = 4,57$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$  für die „sofortige“ Sensitivierung und  $F = 4,40$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$  für die „gesamte“ Sensitivierung], wie die durchgeführte ANOVA zeigte.

Durch nachfolgende Tukey-Tests wurde festgestellt, dass sich in den ersten beiden zusammengefassten Blöcken (B 1-2 und B 3-4) alle drei Transfergruppen signifikant voneinander unterschieden. Der Transfer von C3H-Blastozysten führte hier zu einer erhöhten Amplitude der ASR beim Nachwuchs, Nachkommen des isogenen Transfers zeigten die niedrigste Amplitude und der Transfer von NMRI-Blastozysten führte zu einem intermediären Verhalten des Nachwuchses. Nach den Fußschocks existierte kein Unterschied mehr zwischen Nachkommen von C3H- und NMRI-Blastozysten in der Amplitude der ASR. Weiterhin zeigten Nachkommen des isogenen Transfers eine höhere „sofortige“ Sensitivierung der ASR im Vergleich zum Transfer von C3H-Blastozysten. Nachkommen des Transfers von NMRI-Blastozysten wiesen eine höhere „gesamte“ Sensitivierung des Reflexes auf als Nachkommen von C3H-Blastozysten (Abb.16c).

## Transfer in DBA versus unbehandelte Tiere

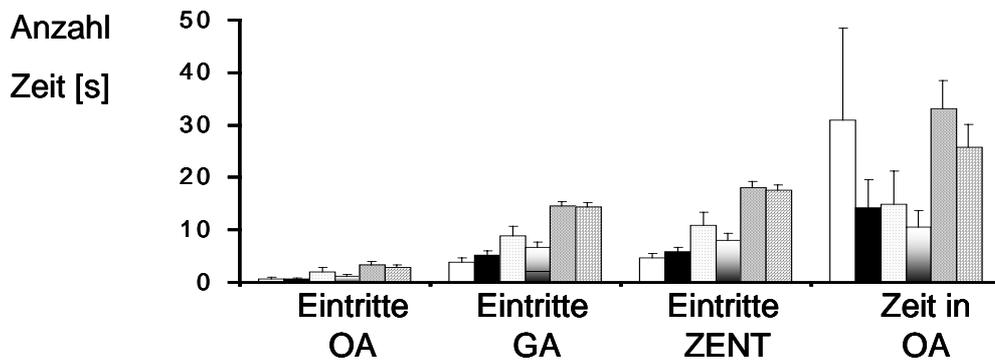
**a**

### Motilitätsbox



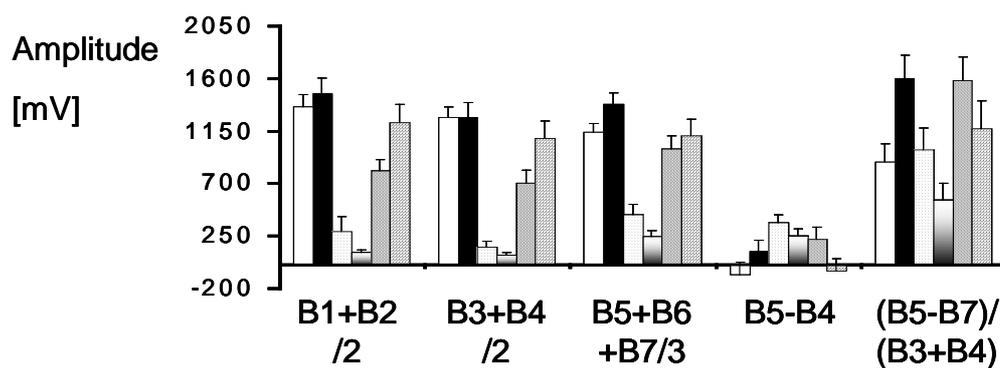
**b**

### Elevated Plus-Maze



**c**

### Furcht-sensitivierte ASR



**Gruppen**



Abb.16

Abb.16. Genetische Einflüsse beim Transfer von Blastozysten in DBA-Rezipienten.

Die genetischen Effekte wurden analysiert durch den Vergleich des Verhalten des Nachwuchses von genetisch unterschiedlichen Blastozysten (C3H, DBA und NMRI), welche in DBA-Leihmütter transferiert wurden. Hier wurde das Verhalten des resultierenden Nachwuchses a) in der Motilitätsbox b) auf dem EPM und c) in der Furcht-sensitivierten ASR verglichen mit dem Verhalten der unbehandelten Tiere. Verhaltensmessungen wurden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. Die horizontale, vertikale und zentrale Aktivität in der Motilitätsbox sowie die in den offenen Armen des EPM verbrachte Zeit wurde in Sekunden dargestellt. Auch die Anzahl von Aufrichtungen/Anlehnungen an die Wände in der Motilitätsbox sowie die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Kompartimente des EPM wurden dargestellt, ebenso wie die Amplitude der Schreckreaktion und die „sofortige“ (B5-B4) und „gesamte“ (B5-B7)/(B3+B4) Sensitivierung der ASR, welche in mV gemessen wurden.

OA = offene Arme des EPM

GA = geschlossene Arme des EPM

ZENT = zentrale Plattform des EPM

Für Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der untersuchten Parameter der Nachkommen der reziproken Transfergruppen siehe Anhang Tab.6.

Variable	ANOVA und Tukey-Tests der Transfers				
	DD – CD - ND		Tukey-Tests		
	F-Werte	p-Werte	DD-CD	DD-ND	CD-ND
<b>Motilitätsbox</b>					
Horizont. Exploration	<b>31,29</b>	<b>&lt; 0,001</b>	-	+	+
Weg	<b>36,49</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	-	+
Aufrichtzeit	<b>50,89</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
Zahl Aufrichtungen	<b>69,72</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
Zentrale Exploration	0,69	> 0,1			
<b>Elevated Plus-Maze</b>					
Eintritte in OA	<b>8,00</b>	<b>&lt; 0,01</b>	-	-	+
Zeit in OA	0,39	> 0,1			
Relative Zeit OA	0,39	> 0,1			
OA/OA+CA	0,70	> 0,1			
<b>Akustische Schreckreaktion</b>					
B1+B2/2	<b>20,66</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
B3+B4/2	<b>25,04</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
B5+B6+B7/3	<b>10,58</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	-
B5 - B4	<b>4,57</b>	<b>0,02</b>	+	-	-
(B5-7) – (B3-4)	<b>4,40</b>	<b>0,02</b>	-	-	+

Tab.11. ANOVA und Tukey-Tests der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in DBA-Leihmütter. Signifikante F- und p-Werte wurden fett dargestellt.

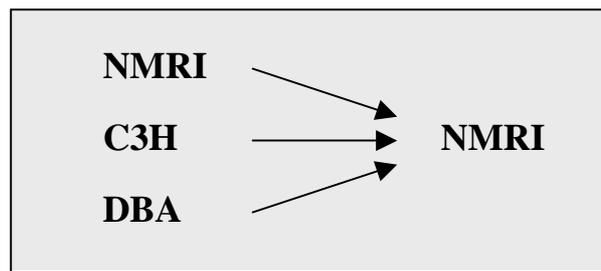
Anzahl der Freiheitsgrade df = 2

OA = offene Arme des EPM

GA = geschlossene Arme des EPM

für Details siehe Anhang Tab.7

#### 4.2.1.3 Transfer von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in NMRI-Rezipienten



Auch bei Nachkommen von NMRI-Leihmüttern wurden durch den Vergleich der Transfergruppen NMRI in NMRI, C3H in NMRI und DBA in NMRI signifikante genetische Effekte auf das Verhalten des Nachwuchses ermittelt. In der Motilitätsbox zeigte der Nachwuchs der drei Transfergruppen signifikante Verhaltensunterschiede in der mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit [ $F = 8,00$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ], dem zurückgelegten Weg [ $F = 30,31$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], der mit Aufrichtverhalten verbrachten Zeit [ $F = 40,82$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] und der Anzahl der Aufrichtungen [ $F = 39,99$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], wie die durchgeführte ANOVA zeigte. Wieder wurden keine genetischen Einflüsse auf die Verweildauer im Zentrum der Box gefunden (Tab.12).

Anschließend paarweise Gruppenvergleiche erfolgten mit Hilfe von Tukey-Tests. Der Transfer von C3H-Blastozysten in NMRI-Rezipienten führte bei den Nachkommen zu einer geringeren mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit im Vergleich mit dem isogenen Transfer, sowie zu einer kürzeren zurückgelegten Wegstrecke im Vergleich zum Transfer von NMRI- und DBA-Blastozysten. Beim Aufrichtverhalten unterschieden sich alle drei Transfergruppen signifikant voneinander, wobei der Transfer von C3H-Blastozysten zu einem geringeren Aufrichtverhalten führte, der isogene Transfer zeigte das höchste Aufrichtverhalten und der Transfer von DBA-Blastozysten lieferte intermediäre Werte (Abb.17a).

Auf dem EPM zeigte die ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den drei Transfergruppen in der Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Kompartimente [ $F = 14,89$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl von Eintritten in die offenen Arme;  $F = 19,01$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl von Eintritten in die geschlossenen Arme und  $F = 25,40$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Anzahl von Eintritten in die zentrale Plattform], wie auch in der in diesen Kompartimenten verbrachten Zeit [ $F = 5,96$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die verbrachte Zeit in den offenen Armen;  $F = 12,88$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die verbrachte Zeit in den geschlossenen Armen und  $F = 12,29$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die verbrachte Zeit auf der zentralen Plattform]. Auch die relative verbrachte Zeit in den offenen Armen [ $F = 5,97$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ] und der Quotient

(verbrachte Zeit in offenen Armen/verbrachte Zeit in geschlossenen Armen) [ $F = 5,65$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ] unterschieden sich signifikant zwischen dem Nachwuchs der Transfergruppen. Anschließende Tukey-Tests ergaben, dass der Transfer von DBA- oder C3H-Blastozysten in NMRI-Leihmütter beim Nachwuchs zu einer verminderten Anzahl von Eintritten in die offenen und geschlossenen Arme, wie auch in die zentrale Plattform des Maze führte, im Vergleich zum isogenen Transfer. Weiterhin verbrachten die Nachkommen von C3H- und DBA-Blastozysten weniger Zeit in den offenen Armen und in der zentralen Plattform des Maze, hielten sich im Gegenzug jedoch länger in den geschlossenen Armen auf, verglichen mit den Nachkommen des isogenen Transfers (Abb.17b). Beim Nachwuchs des isogenen Transfers war der Anteil der in den offenen Armen verbrachten Zeit (sowohl bezogen auf die Gesamtzeit als auch bezogen auf die verbrachte Zeit in den geschlossenen Armen) signifikant höher als bei den Nachkommen der Transfers von C3H- und DBA-Blastozysten.

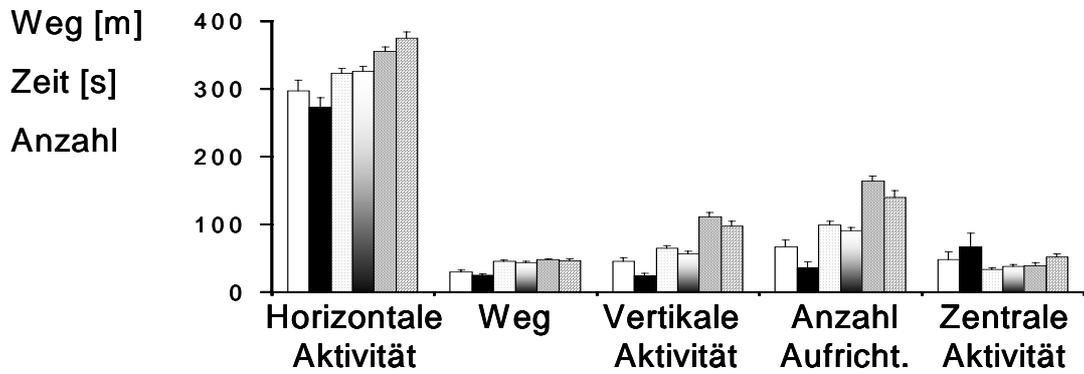
In der Furcht-sensitvierten ASR wurden fast alle untersuchten Parameter vom genetischen Hintergrund der transferierten Blastozysten beeinflusst. Die Nachkommen der drei Transfergruppen unterschieden sich signifikant in der Amplitude der ASR [ $F = 74,83$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 1-2;  $F = 39,54$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 3-4 und  $F = 21,68$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für B 5-7], wie auch in der „sofortigen“ Sensitivierung dieses Reflexes [ $F = 5,45$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ]. Die Unterschiede in der „gesamten“ Sensitivierung lagen an der Signifikanzgrenze [ $F = 3,17$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,05$ ].

Die Tukey-Tests zeigten, dass der Transfer von DBA-Blastozysten in NMRI-Rezipienten zu einer geringeren Amplitude der ASR beim Nachwuchs führte im Vergleich zum isogenen Transfer, jedoch nicht im mittleren Block (B 3-4). Im Gegensatz dazu führte der Transfer von C3H-Embryonen in NMRI-Leihmütter zu einer höheren Schreckhaftigkeit des Nachwuchses. Weiterhin zeigten die Nachkommen des Transfers von C3H-Blastozysten in NMRI-Rezipienten eine signifikant niedrigere „sofortige“ Sensitivierung im Vergleich zum isogenen Transfer (Abb.17c).

## Transfer in NMRI versus unbehandelte Tiere

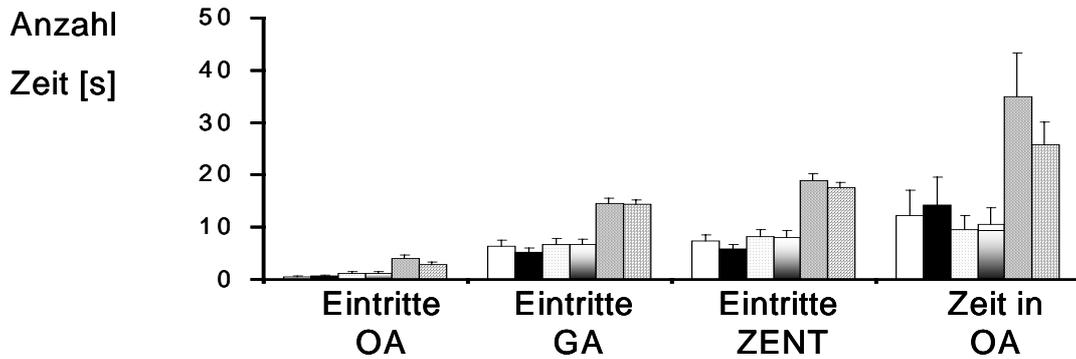
**a**

### Motilitätsbox



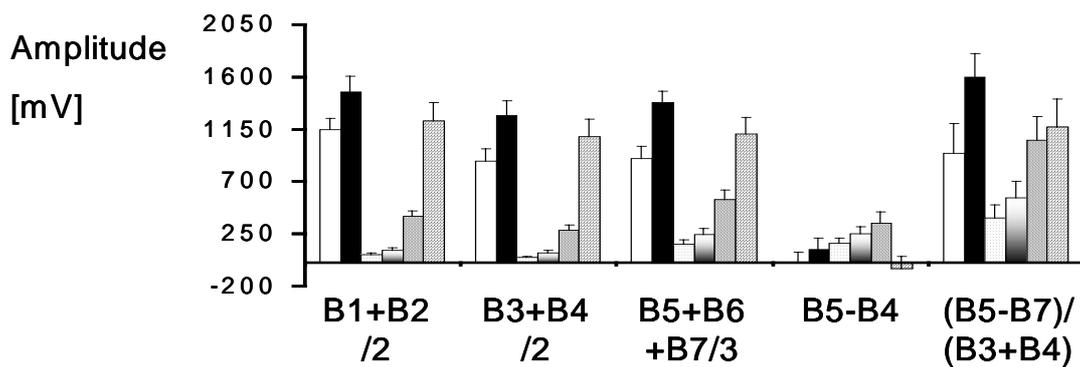
**b**

### Elevated Plus-Maze



**c**

### Furcht-sensitivierete ASR



**Gruppen**

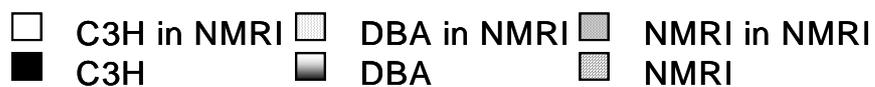


Abb.17

Abb.17. Genetische Einflüsse beim Transfer von Blastozysten in NMRI-Rezipienten.

Die genetischen Effekte wurden analysiert durch den Vergleich des Verhalten des Nachwuchses von genetisch unterschiedlichen Blastozysten (C3H, DBA und NMRI), welche in NMRI-Leihmütter transferiert wurden. Hier wurde das Verhalten des resultierenden Nachwuchses a) in der Motilitätsbox b) auf dem EPM und c) in der Furcht-sensitiven ASR verglichen mit dem Verhalten der unbehandelten Tiere. Verhaltensmessungen wurden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. Die horizontale, vertikale und zentrale Aktivität in der Motilitätsbox sowie die in den offenen Armen des EPM verbrachte Zeit wurde in Sekunden dargestellt. Auch die Anzahl von Aufrichtungen/Anlehnungen an die Wände in der Motilitätsbox sowie die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Kompartimente des EPM wurden dargestellt, ebenso wie die Amplitude der Schreckreaktion und die „sofortige“ (B5-B4) und „gesamte“ (B5-B7)/(B3+B4) Sensitivierung der ASR, welche in mV gemessen wurden.

OA = offene Arme des EPM

GA = geschlossene Arme des EPM

ZENT = zentrale Plattform des EPM

Für Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der untersuchten Parameter der Nachkommen der reziproken Transfergruppen siehe Anhang Tab.6.

Variable	ANOVA und Tukey-Tests der Transfers				
	NN - DN - CN		Tukey-Tests		
	F-Werte	p-Werte	NN-DN	NN-CN	DN-CN
<b>Motilitätsbox</b>					
Horizont. Exploration	<b>8,00</b>	<b>&lt; 0,01</b>	-	+	-
Weg	<b>30,31</b>	<b>&lt; 0,001</b>	-	+	+
Aufrichtzeit	<b>40,82</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
Zahl Aufrichtungen	<b>39,99</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
Zentrale Exploration	1,08	> 0,1			
<b>Elevated Plus-Maze</b>					
Eintritte in OA	<b>14,89</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	-
Zeit in OA	<b>5,96</b>	<b>&lt; 0,01</b>	+	+	-
Relative Zeit OA	<b>5,97</b>	<b>&lt; 0,01</b>	+	+	-
OA/OA+CA	<b>5,65</b>	<b>&lt; 0,01</b>	+	+	-
<b>Akustische Schreckreaktion</b>					
B1+B2/2	<b>74,83</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
B3+B4/2	<b>39,54</b>	<b>&lt; 0,001</b>	-	+	+
B5+B6+B7/3	<b>21,68</b>	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
B5 - B4	<b>5,45</b>	<b>&lt; 0,01</b>	-	+	-
(B5-7) – (B3-4)	3,17	0,05			

Tab.12. ANOVA und Tukey-Tests der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in NMRI-Leihmütter. Signifikante F- und p-Werte wurden fett, F- und p-Werte nahe der Signifikanzgrenze kursiv dargestellt.

Anzahl der Freiheitsgrade  $df = 2$

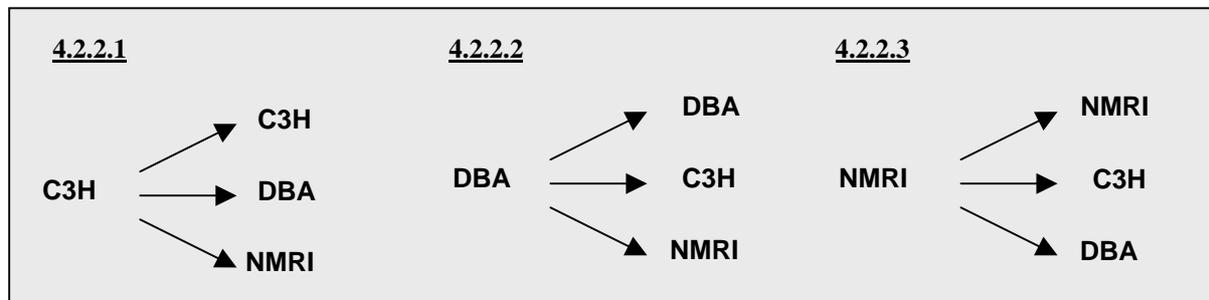
OA = offene Arme des EPM

GA = geschlossene Arme des EPM

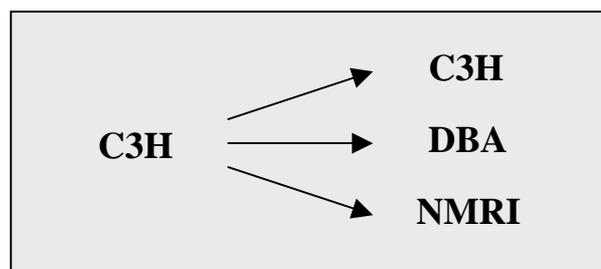
für Details siehe Anhang Tab.7

#### 4.2.2 Bestimmung von maternalen Einflüssen

Maternale Einflüsse auf das Verhalten der adulten Nachkommen wurden durch den Vergleich der Transfers von genetisch identischen Blastozysten in Leihmütter der drei Stämme ermittelt. Dies wurde für Blastozysten aller drei Mäusestämme durchgeführt.



##### 4.2.2.1 Transfer von C3H-Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme



Maternale Einflüsse auf das Verhalten des adulten Nachwuchses des Stammes C3H wurden durch Vergleich der Transfergruppen C3H in C3H, C3H in DBA und C3H in NMRI ermittelt. Die Mäuse dieser Gruppen hatten denselben genetischen Hintergrund, entwickelten sich aber in unterschiedlichen maternalen Umwelten.

Maternale Einflüsse auf das Verhalten des C3H-Nachwuchses wurden in der Motilitätsbox bei der mit Aufrichtungen verbrachten Zeit [ $F = 6,32$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ] und der Anzahl der Aufrichtungen [ $F = 4,16$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$ ] durch eine ein-faktorielle ANOVA ermittelt. Nachfolgende post-hoc Tests zeigten, dass der Transfer in DBA-Leihmütter zu einer signifikanten Reduktion in der mit Aufrichtungen verbrachten Zeit beim Nachwuchs führte im Vergleich zur isogenen Transfergruppe und dem Transfer in NMRI-Leihmütter (Abb.18a). Weiterhin zeigten die Nachkommen des Transfers in DBA-Rezipienten eine signifikant geringere Anzahl von Aufrichtungen als die Nachkommen des Transfers in NMRI-Rezipienten (Abb.18b). Die ANOVA ergab jedoch, dass diese Unterschiede in den ersten 5 Minuten des Verhaltenstests nicht die Signifikanzschwelle erreichten [ $F = 3,04$ ,  $df = 2$ ,

$p = 0,06$ ].

Auf dem EPM erreichten die Verhaltensunterschiede der drei Transfergruppen bei der Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme [ $F = 2,87$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,07$ ] und das Zentrum [ $F = 2,67$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,08$ ] des Maze nicht die Signifikanzgrenze, wie die durchgeführte ein-faktorielle ANOVA zeigte.

Auch ergab diese, dass sich der Nachwuchs der drei Transfergruppen signifikant in den Amplituden der letzten drei Blöcke der ASR unterschied [ $F = 3,28$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,05$ ]. Die Verhaltensunterschiede in den Blöcken 3-4 erreichten jedoch nicht ganz die Signifikanzschwelle [ $F = 3,04$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,06$ ]. Anschließende Tukey-Tests zeigten, dass der Transfer von C3H-Blastozysten in NMRI-Leihmütter zu einer Reduktion der ASR im Vergleich zum isogenen Transfer führte. Der Transfer in DBA-Leihmütter verursachte keine Verhaltensänderungen beim Nachwuchs (Abb.18c).

Für detaillierte Einzelergebnisse siehe Anhang Tab.8.

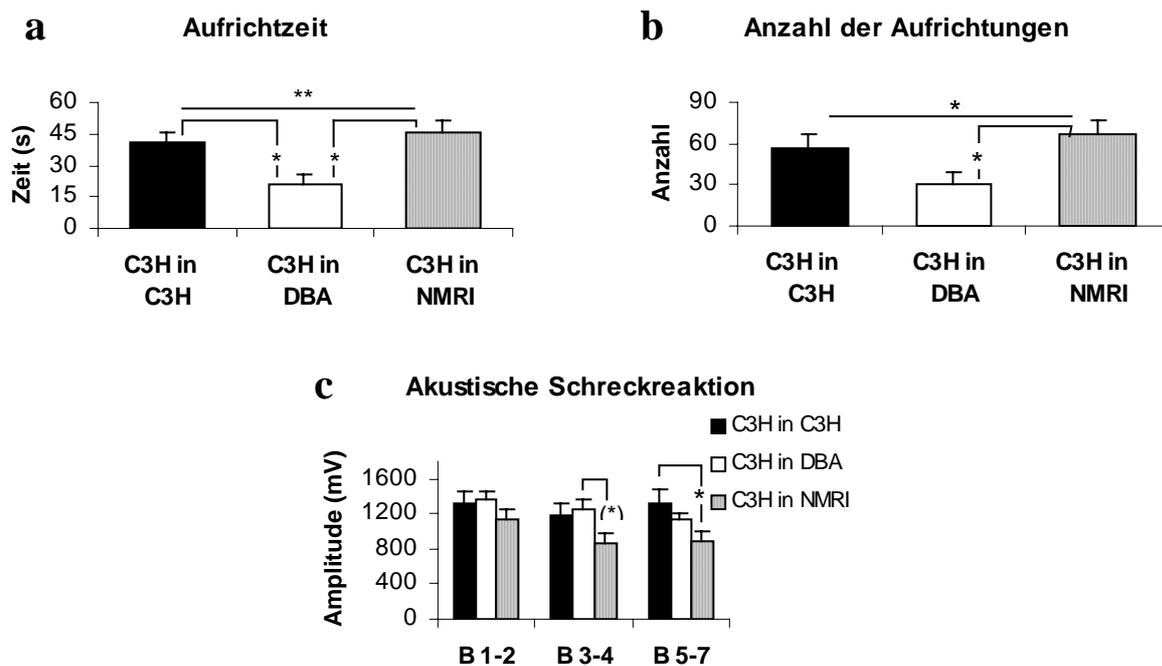
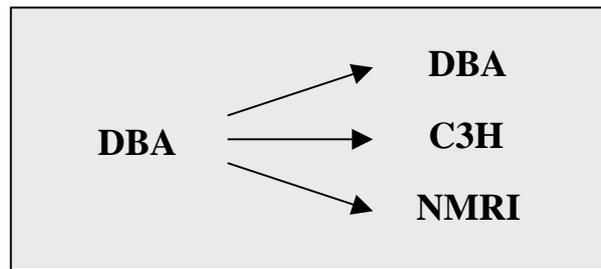


Abb.18. Maternale Effekte auf Blastozysten von C3H-Mäusen.

Der Transfer von C3H-Blastozysten in DBA-Leihmütter führte beim Nachwuchs zu einer signifikant geringeren mit Aufrichtungen verbrachten Zeit in der Motilitätsbox (a). Nachkommen der Transfergruppe C3H in DBA richteten sich in der Motilitätsbox weniger auf als Nachkommen der Transfergruppe C3H in NMRI (b). Der Nachwuchs des Transfers von C3H-Blastozysten in NMRI-Rezipienten zeigte eine geringeren Amplitude der ASR im Mittelwert der Blöcke 5-7 verglichen mit dem isogenen Transfer (c).

(\*):  $p = 0,05-0,1$ ; \*:  $p < 0,05-0,01$ ; \*\*:  $p < 0,01-0,001$

#### 4.2.2.2 Transfer von DBA-Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme



Durch den Vergleich der Transfergruppen DBA in DBA, DBA in C3H und DBA in NMRI wurden maternale Einflüsse auf das Verhalten des Nachwuchses von DBA-Blastozysten untersucht. Der genetische Hintergrund der Rezipienten beeinflusste auch hier wieder die mit Aufrichtungen verbrachte Zeit und die Anzahl der Aufrichtungen des Nachwuchses in der Motilitätsbox. Jedoch zeigte die ein-faktorielle ANOVA, dass die Verhaltensunterschiede über die gesamte Testperiode hinweg betrachtet nicht die Signifikanzschwelle erreichten [ $F = 3,11$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,06$  für die mit Aufrichtungen verbrachte Zeit und  $F = 2,51$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,1$  für die Anzahl von Aufrichtungen]. In den ersten 5 Minuten des Tests existierten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Transfergruppen [ $F = 4,01$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,03$  für die mit Aufrichtungen verbrachte Zeit und  $F = 4,38$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$  für die Anzahl von Aufrichtungen]. Der Transfer von DBA-Blastozysten in NMRI-Rezipienten führte hier zu einer längeren Zeit, welche der Nachwuchs mit Aufrichtverhalten verbrachte, und zu einer höheren Anzahl von Aufrichtungen verglichen mit der isogenen Transfergruppe, wie nachfolgende Tukey-Tests ergaben. Der Transfer von DBA-Blastozysten in C3H-Rezipienten führte zu keinen signifikanten Unterschieden verglichen mit dem isogenen Transfer oder mit der Gruppe DBA in NMRI.

Auch auf dem EPM erreichten die Unterschiede zwischen den Transfergruppen in der Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme [ $F = 2,84$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,07$ ] und das Zentrum [ $F = 2,47$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,1$ ] wieder nicht die Signifikanzschwelle, wie die ANOVA zeigte.

Auch ergab diese wieder einen signifikanten Einfluss von maternalen Faktoren auf die Amplitude der ASR [ $F = 4,42$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$  für B 1-2;  $F = 4,14$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$  für B 3-4 und  $F = 4,53$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$  für B 5-7]. Anschließende post-hoc Tests ermittelten, dass der Transfer von DBA-Blastozysten in NMRI- und C3H-Rezipienten zu einer Reduktion der Amplitude der ASR beim Nachwuchs in allen Blöcken führte, außer beim Transfer in C3H-Rezipienten bei B 5-7, verglichen mit der isogenen Transfergruppe. Die beiden Transfergruppen selbst unterschieden sich nicht signifikant in ihrem Verhalten (Abb.19a).

Die maternale Umwelt beeinflusste auch die Sensitivierung der ASR [ $F = 2,66$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,08$  für die „sofortige“ Sensitivierung und  $F = 3,77$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,03$  für die „gesamte“ Sensitivierung]. Nachkommen des Transfers von DBA-Blastozysten in NMRI-Rezipienten zeigten eine signifikante Reduktion der „gesamten“ Sensitivierung (B 5-7 minus B 3-4) verglichen mit Nachwuchs des isogenen Transfers (Abb.19b), das heißt, der Transfer in die maternale Umwelt von NMRI-Rezipienten führte zu einem verminderten Angstverhalten. Bei der „sofortigen“ Sensitivierung erreichte dieser Unterschied nicht die Signifikanzschwelle. Der Transfer von Blastozysten in C3H-Leihmütter führte zu keiner signifikanten Verhaltensänderung, verglichen mit dem isogenen Transfer oder dem Transfer in NMRI-Rezipienten. Für detaillierte Einzelergebnisse siehe Anhang Tab.8.

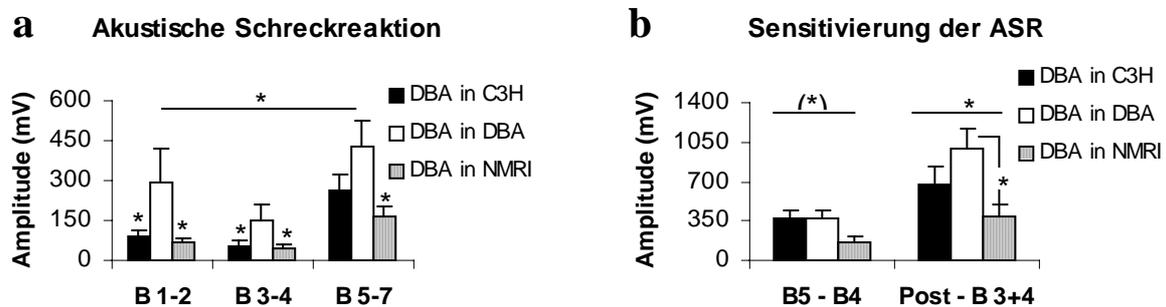
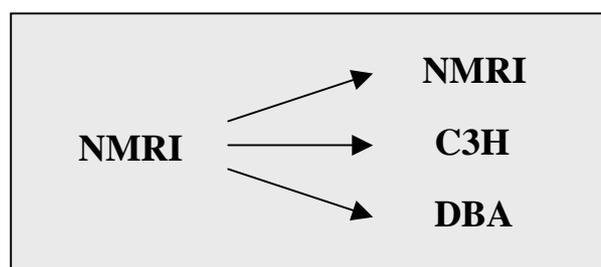


Abb.19. Maternale Effekte auf Blastozysten von DBA-Mäusen.

Der Transfer von DBA-Blastozysten in C3H- oder NMRI-Rezipienten führte zu einer geringeren Amplitude der ASR beim Nachwuchs (a). Die Sensitivierung dieses Reflexes war signifikant geringer beim Nachwuchs von DBA-Blastozysten, welche in NMRI-Leihmütter transferiert wurden, im Vergleich mit Nachkommen des isogenen Transfers (b).

(\*):  $p = 0,05-0,1$ ; \* =  $p < 0,05-0,01$

#### 4.2.2.3 Transfer von NMRI-Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme



Materale Einflüsse auf das Verhalten des Nachwuchses von NMRI-Blastozysten wurden durch den Vergleich der Transfergruppen NMRI in NMRI, NMRI in C3H und NMRI in DBA ermittelt. Im Gegensatz zu den Inzuchtstämmen DBA und C3H wurde beim Transfer von Blastozysten des Auszuchtstammes NMRI eine Vielzahl von Parametern in allen Verhaltenstests gefunden, welche von maternalen Faktoren beeinflusst wurden.

Die ein-faktorielle ANOVA zeigte, dass sich alle untersuchten Verhaltensparameter der Motilitätsbox signifikant zwischen den drei Transfergruppen unterschieden [ $F = 10,54$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die mit horizontaler Exploration verbrachte Zeit;  $F = 6,41$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für den zurückgelegten Weg;  $F = 6,86$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die mit Aufrichtungen verbrachte Zeit;  $F = 5,26$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die Anzahl der Aufrichtungen und  $F = 7,42$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für die im Zentrum der Box verbrachte Zeit].

Der Transfer von NMRI-Blastozysten in DBA-Rezipienten führte bei den Nachkommen zu einer höheren lokomotorischen Aktivität in x-, y-Richtung, verglichen mit den Nachkommen des isogenen Transfers oder des Transfers in C3H-Rezipienten (Abb.20a), wie nachfolgende Tukey-Tests ermittelten. Im Gegensatz dazu zeigten Nachkommen des Transfers von NMRI-Blastozysten in C3H-Leihmütter einen signifikant geringeren zurückgelegten Weg in den ersten 5 Minuten des Tests und über die gesamte Testzeit betrachtet, der Transfer in DBA-Leihmütter führte zu keiner signifikanten Verhaltensänderung (Abb.20b). Beim Transfer von NMRI-Blastozysten in DBA-Rezipienten verbrachten die Nachkommen weniger Zeit mit Aufrichtverhalten und zeigten auch eine geringere Anzahl von Aufrichtungen als die Mäuse des isogenen Transfers oder des Transfers in C3H-Rezipienten (Abb.20c und d). Jedoch führte der Transfer von NMRI-Blastozysten in C3H- oder DBA-Rezipienten zu einer signifikant längeren Verweilzeit des Nachwuchses im Zentrum der Box verglichen mit dem isogenen Transfer, was darauf hinwies, dass diese Tiere weniger ängstlich waren (Abb.20e).

Beim Auszuchtstamm NMRI zeigte die ein-faktorielle ANOVA erstmals einen maternalen Einfluss auf einen Verhaltensparameter des EPM. Die drei Transfergruppen unterschieden sich signifikant in der in der zentralen Plattform des Maze verbrachten Zeit [ $F = 6,14$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ], wobei anschließende Tukey-Tests ergaben, dass der Nachwuchs des Transfers in C3H-Leihmütter weniger Zeit auf diesem Kompartiment verbrachte als Nachkommen des isogenen Transfers oder des Transfers in DBA-Rezipienten (Abb.20f).

In der ASR zeigte die ein-faktorielle ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den Transfergruppen in den Amplituden fast aller Blöcke [ $F = 6,31$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$  für B 1-2;  $F = 4,93$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,01$  für B 3-4 und  $F = 4,41$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,02$  für B 5-7], einzig bei Block 6 bestanden keine Verhaltensunterschiede. Die post-hoc Tests ermittelten, dass der Transfer von NMRI-Blastozysten in C3H- oder DBA-Rezipienten zu einer höheren Amplitude der ASR bei den Nachkommen in allen Blöcken führte, außer bei Block 1-2 beim Nachwuchs der Gruppe NMRI in DBA (Abb.20g).

Für detaillierte Einzelergebnisse siehe Anhang Tab. 8.

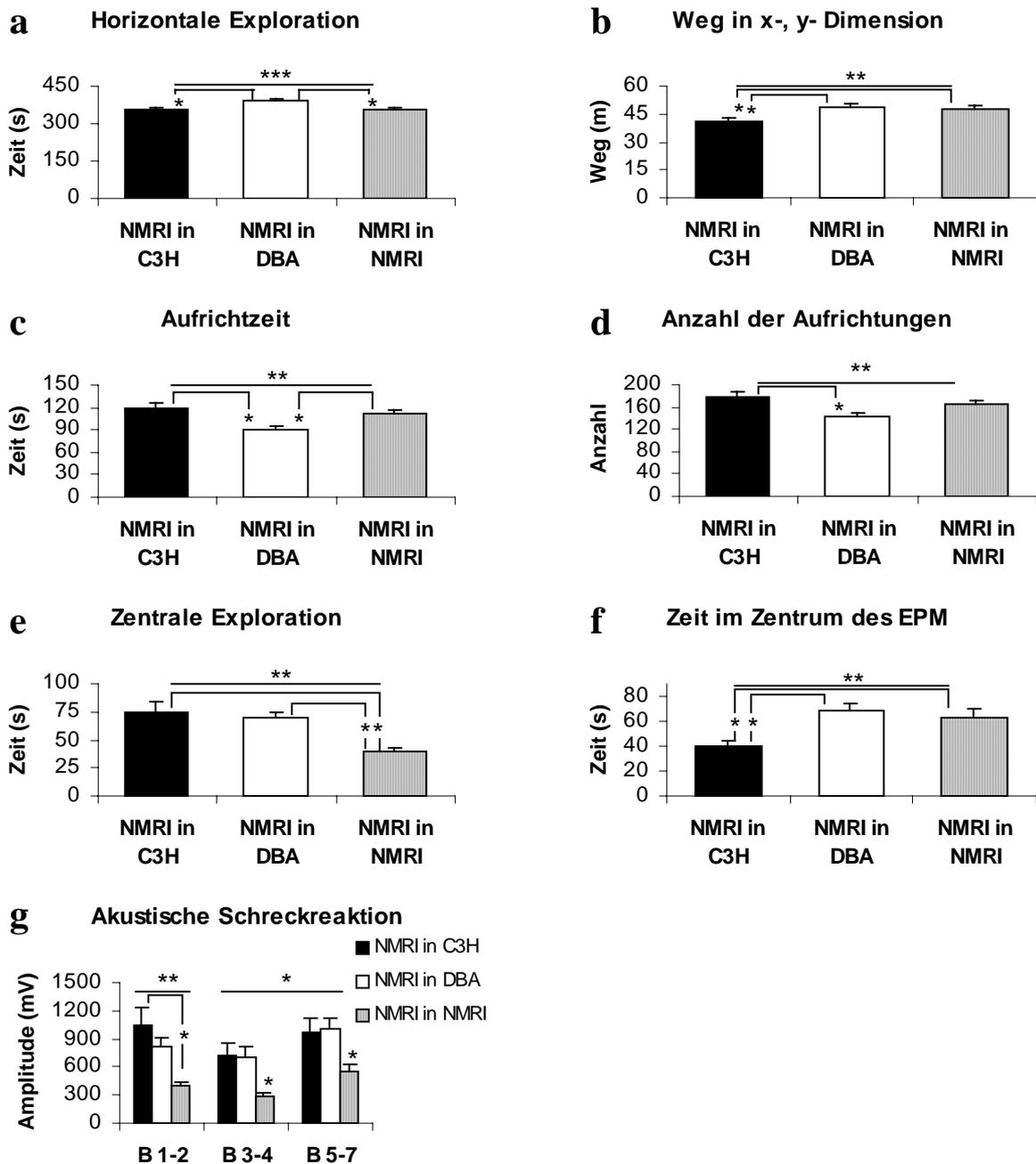


Abb.20. Maternale Effekte auf Blastozysten von NMRI-Mäusen.

Der Transfer von NMRI-Blastozysten in DBA-Rezipienten führte zu einer höheren horizontalen Exploration beim Nachwuchs (a), während der Transfer in C3H-Rezipienten zu einer signifikanten Reduktion im zurückgelegten Weg führte (b). Der Nachwuchs des Transfers in DBA-Leihmütter verbrachte eine kürzere Zeit mit Aufrichtverhalten (c) und zeigte eine geringere Anzahl von Aufrichtungen im Vergleich zum isogenen Transfer und zum Transfer in C3H-Blastozysten (d). Der Nachwuchs des Transfers in C3H- oder DBA-Leihmütter verbrachte eine längere Zeit im Zentrum der Motilitätsbox (e), während der Transfer in C3H-Rezipienten zu einer signifikant reduzierten Verweildauer auf der zentralen Plattform des EPM führte (f). Nachkommen der Transfers in C3H- oder DBA-Leihmütter zeigten eine höhere Amplitude der ASR im Vergleich zu Nachkommen des isogenen Transfers (g).

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01-0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

### 4.3 Zusammenfassung der Einzelmerkmale mittels Score-Analyse

Bei jedem der drei durchgeführten Verhaltenstests wurden mehrere Parameter untersucht, die oft ein ähnliches Verhalten messen und teilweise sogar miteinander korrelieren. Um globale Aussagen über das Verhalten zu erhalten, wäre es wünschenswert, diese zu einem Parameter zusammenzufassen. Auf Basis der Überlegungen, die zu den stabilen multivariaten Verfahren von Läuter geführt haben (Läuter, 1996; Läuter et al., 1995), wurden deshalb nach inhaltlichen Kriterien Summenscores für die vier interessierenden Hauptmerkmale des Verhaltens gebildet (Aktivität, Aufrichtung, Angst und Schreckhaftigkeit). Jeder Score wurde durch mehrere einzelne Merkmale repräsentiert, wobei alle Merkmale die gleiche Gewichtung erhielten. Durch diese standardisierten Summenscores wurden die vielen Einzelmerkmale auf vier Hauptcharakteristika konzentriert und somit wurden zusammenfassende Interpretationen möglich. Für die statistische Analyse liefern diese Scores jedoch keine neuen Erkenntnisse. Zur Berechnung der Summenscores wurde bei den Verhaltensparametern der Motilitätsbox nur die gesamte Testzeit von 10 Minuten betrachtet. Diejenigen Merkmale, welche eine Verhaltensänderung in die gleiche Richtung bewirkten, wurden bei der Berechnung mit dem gleichen Vorzeichen versehen.

Zusammensetzung der einzelnen Summenscores:

- **Aktivität** = Horizontale Exploration + Weg + Weg/Zeit + Eintritte GA + Eintritte ZENT
- **Aufrichtung** = Aufrichtzeit + Anzahl Aufrichtungen + Anzahl Aufrichtungen/Zeit
- **Angst** = Zentrale Exploration + Eintritte OA + relative Zeit in OA + Quotient Zeit OA/GA-  
(B5 minus B4) – (B 5-7 minus B 3-4)
- **Schreckhaftigkeit** = Block 1 + Block 2 + Block 3 + Block 4 + Block 5 + Block 6 + Block 7

Mit den berechneten Summenscores der neun Transfergruppen wurde wiederum zur allgemeinen Übersicht eine drei-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Embryo-Donatoren (genetische Effekte), Embryo-Rezipienten (maternale Effekte) und Geschlecht durchgeführt (Tab.13).

Die Aktivität der Tiere wurde von den Embryo-Donatoren, also dem genetischen Hintergrund determiniert [ $F = 106,89$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], des Weiteren existierte eine signifikante Wechselwirkung zwischen Embryo-Donatoren und Rezipienten [ $F = 3,62$ ,  $df = 4$ ,  $p < 0,01$ ]. Im Gegensatz dazu wurde das Aufrichtverhalten der Tiere sowohl von der genetischen Abstammung der Blastozysten [ $F = 80,33$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] als auch von maternalen

Faktoren beeinflusst [ $F = 12,78$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ], jedoch existierten hier keinerlei Wechselwirkungen zwischen den beiden Faktoren. Das Angstverhalten der Tiere war alleine von der genetischen Herkunft der Embryonen abhängig [ $F = 3,55$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,03$ ]. Bei der Schreckhaftigkeit der Tiere spielte das Geschlecht eine signifikante Rolle [ $F = 9,36$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,01$ ]. Weiterhin wurde dieses Verhalten sowohl von den Embryo-Donatoren [ $F = 80,81$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] als auch von den Rezipienten [ $F = 7,97$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ] signifikant beeinflusst, es spielten also sowohl genetische wie auch maternale Faktoren bei der Ausprägung dieses Verhaltens eine Rolle. Die Wechselwirkung zwischen Embryo-Donatoren und Geschlecht erreichte die Signifikanzgrenze nicht [ $F = 2,65$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0,07$ ].

Variable	Geschlecht df = 1	Donatoren df = 2	Rezipienten df = 2	Donatoren × Rezipienten df = 4	Donatoren × Geschlecht df = 2	Rezipienten × Geschlecht df = 2
<b>Aktivität</b>	F=0,62 p > 0,1	F=106,89 p < 0,001	F=1,01 p > 0,1	F=3,62 p < 0,01	F=0,57 p > 0,1	F=0,29 p > 0,1
<b>Aufrichtung</b>	F=0,24 p > 0,1	F=80,33 p < 0,001	F=12,78 p < 0,001	F=0,55 p > 0,1	F=0,09 p > 0,1	F=0,43 p > 0,1
<b>Angst</b>	F=0,00 p > 0,1	F=3,55 p = 0,03	F=0,46 p > 0,1	F=0,89 p > 0,1	F=1,06 p > 0,1	F=0,34 p > 0,1
Schreck- haftigkeit	F=9,36 p < 0,01	F=80,81 p < 0,001	F=7,97 p < 0,001	F=1,31 p > 0,1	F=2,65 p = 0,07	F=1,01 p > 0,1

Tab.13. Ergebnisse der drei-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Embryo-Donatoren, Embryo-Rezipienten und Geschlecht für die Summenscores des Verhaltens der reziproken Transfers der Stämme C3H, DBA und NMRI.

df = Anzahl der Freiheitsgrade

rot = signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ )

gelb = p-Werte nahe der Signifikanzgrenze ( $p = 0,05$  bis  $p < 0,1$ )

#### 4.4 Interpretation der Ergebnisse mit Hilfe der Summenscores

Zur Ermittlung der genetischen und maternalen Einflüsse auf die Summenscores des Verhaltens bei den verschiedenen Stämmen wurden ein-faktorielle ANOVAs mit anschließenden Tukey-Tests durchgeführt. Genetische Einflüsse auf das Verhalten des Nachwuchses wurden wieder durch den Vergleich der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in definierte Rezipienten ermittelt, maternale Effekte durch den Vergleich der Transfers von genetisch identischen Blastozysten in Rezipienten der verschiedenen Stämme.

Für detaillierte Ergebnisse siehe Anhang Tab.9a und b.

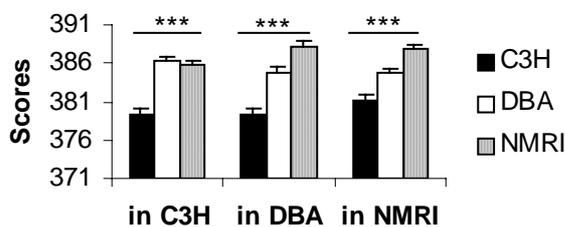
### a) Aktivität

Die ein-faktoriellen ANOVAs zeigten, dass die Aktivität der Tiere vor allem durch ihre genetische Abstammung determiniert wurde [ $F = 37,62$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Transfers in C3H-Blastozysten,  $F = 49,94$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Transfers in DBA-Blastozysten und  $F = 30,71$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Transfers in NMRI-Blastozysten].

Nachkommen von NMRI-Blastozysten waren am aktivsten, Nachkommen von DBA-Embryonen zeigten intermediäre Werte und der Nachwuchs von C3H-Blastozysten zeigte generell die geringste Aktivität, wie die anschließenden post-hoc Tests zeigten. Einzig beim Transfer in C3H-Leihmütter konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Nachkommen von DBA- und NMRI-Blastozysten festgestellt werden (Abb.21a).

Maternale Faktoren hatten nur bei Blastozysten des Auszuchtstammes NMRI einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Nachkommen [ $F = 5,45$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ], wobei der Transfer in C3H-Leihmütter zu einer niedrigeren Aktivität des Nachwuchses führte, verglichen mit dem isogenen Transfer und dem Transfer in DBA-Rezipienten (Abb.21b).

#### a Aktivität - genetische Einflüsse



#### b Aktivität - maternale Einflüsse

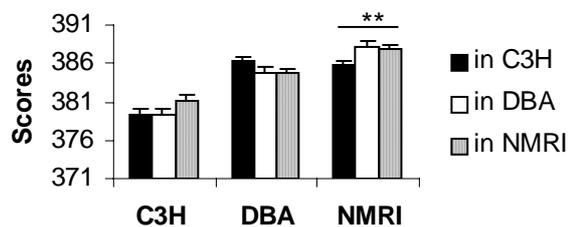


Abb.21. Genetische (a) und maternale (b) Einflüsse auf die Aktivität der Nachkommen.

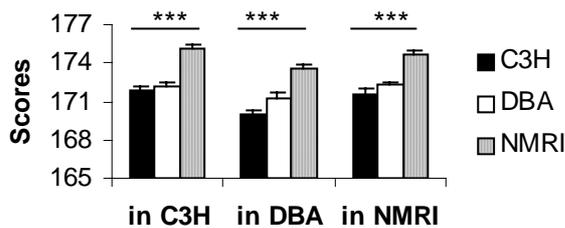
\*\* :  $p < 0,01-0,001$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$

### b) Aufrichtung

Beim Transfer von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in Leihmütter desselben Stammes zeigte die ein-faktoriellen ANOVAs einen signifikanten Einfluss der genetischen Herkunft der Embryonen auf das Aufrichtverhalten des Nachwuchses [ $F = 26,57$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Transfers in C3H-Rezipienten,  $F = 32,93$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Transfers in DBA-Rezipienten und  $F = 28,82$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Transfers in NMRI-Rezipienten]. Anschließende Tukey-Tests ergaben, dass Nachkommen von NMRI-Blastozysten ein höheres Aufrichtverhalten aufwiesen als Nachkommen von C3H- und DBA-Blastozysten (Abb.22a).

Jedoch zeigten die ANOVAs bei diesem Verhalten auch einen signifikanten maternalen Effekt auf C3H-Blastozysten [ $F = 5,85$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ] und NMRI-Blastozysten [ $F = 7,37$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ], während dieser bei Embryonen des DBA-Stammes an der Signifikanzgrenze lag [ $F = 3,18$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,05$ ]. Der Transfer von C3H- und NMRI-Blastozysten in DBA-Leihmütter führte zu einem geringeren Aufrichtverhalten des Nachwuchses im Vergleich zu den Transfers in Leihmütter der Stämme C3H und DBA, wie durch post-hoc Tests ermittelt wurde (Abb.22b).

### a Aufrichtung-genetische Einflüsse



### b Aufrichtung-maternale Einflüsse

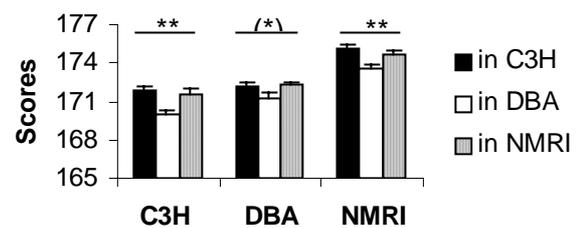


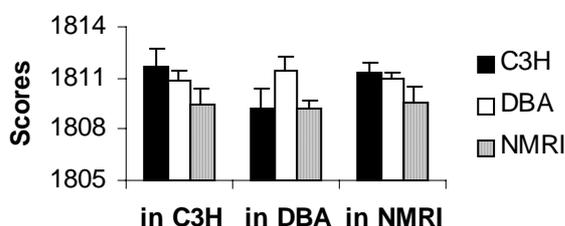
Abb.22. Genetische (a) und maternale (b) Einflüsse auf das Aufrichtverhalten der Nachkommen. (\*):  $p = 0,05-0,1$ ; (\*\*):  $p < 0,01-0,001$ ; (\*\*\*):  $p < 0,001$

### c) Angstverhalten

Die drei-faktorielle ANOVA zeigte zwar einen signifikanten Einfluss der genetischen Herkunft der Embryonen auf das Angstverhalten des Nachwuchses, jedoch konnte dieser bei der Einzelbetrachtung der Transfergruppen nicht gefunden werden (Abb.23a).

Weiterhin spielten auch maternale Effekte bei der Ausprägung des Angstverhaltens beim adulten Nachwuchs keine signifikante Rolle (Abb.23b).

### a Angst - genetische Einflüsse



### b Angst - maternale Einflüsse

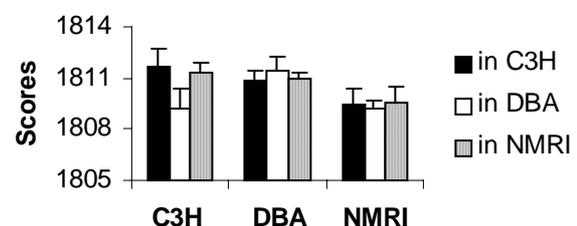


Abb.23. Genetische (a) und maternale (b) Einflüsse auf das Angstverhalten der Nachkommen.

#### d) Schreckhaftigkeit

Die ANOVAs zeigten beim Transfer von genetisch unterschiedlichen Embryonen in Leihmütter desselben Stammes einen signifikanten Einfluss der genetischen Herkunft der Embryonen auf die Schreckhaftigkeit der Nachkommen [ $F = 24,60$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Transfers in C3H-Rezipienten,  $F = 19,15$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Transfers in DBA-Rezipienten und  $F = 44,80$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$  für die Transfers in NMRI-Rezipienten]. Die nachfolgenden Tukey-Tests ergaben, dass der Transfer von C3H-Blastozysten zu der höchsten Schreckhaftigkeit beim Nachwuchs führte, Nachkommen von NMRI-Blastozysten zeigten intermediäre Amplituden der ASR, während Nachkommen von DBA-Blastozysten am wenigsten schreckhaft waren. Nur beim Transfer in C3H-Leihmütter existierten keine signifikanten Unterschiede in der Schreckhaftigkeit der Nachkommen von C3H- und NMRI-Blastozysten (Abb.24a).

Des Weiteren zeigten die ein-faktoriellen ANOVAs signifikante maternale Einflüsse auf die Schreckhaftigkeit der Nachkommen von DBA-Blastozysten [ $F = 5,08$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,01$ ] und NMRI-Blastozysten [ $F = 5,53$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ], während diese beim Nachwuchs von C3H-Embryonen die Signifikanzschwelle nicht erreichten [ $F = 2,75$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,07$ ]. Die maternale Umwelt einer NMRI-Leihmutter führte bei NMRI-Embryonen zu einer geringeren Schreckhaftigkeit des Nachwuchses im Vergleich zur maternalen Umwelt von DBA- oder C3H-Leihmüttern, wie anschließende post-hoc Tests zeigten. Bei DBA-Embryonen führte der Transfer in NMRI-Leihmütter ebenfalls zu weniger schreckhaften Nachkommen, jedoch nur im Vergleich mit dem isogenen Transfer (Abb.24b).

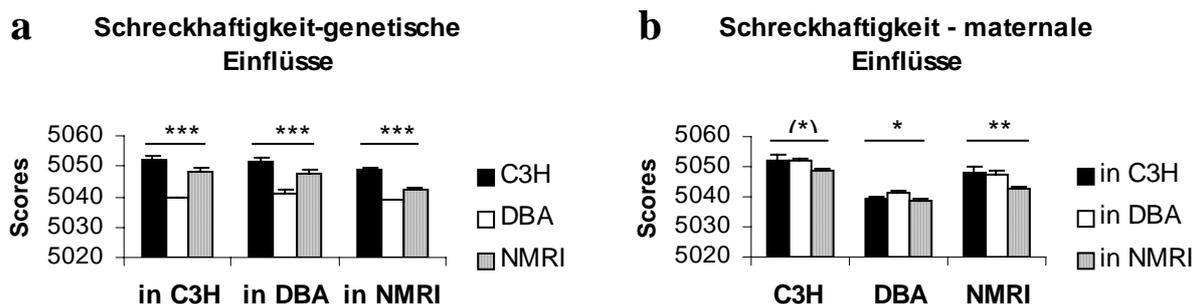


Abb.24. Genetische (a) und maternale (b) Einflüsse auf die Schreckhaftigkeit der Nachkommen.

(\*):  $p = 0,05-0,1$ ; \*:  $p < 0,05-0,01$ ; \*\*:  $p < 0,01-0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

## **5. Abschätzung des Einflusses uteriner und postnataler Faktoren**

Die beobachteten maternalen Einflüsse auf das Verhalten des Nachwuchses könnten sowohl während der Tragzeit im Uterus der Leihmutter auf den sich entwickelnden Nachwuchs eingewirkt haben, wie auch in der postnatalen Periode, da die Nachkommen noch bis zur Entwöhnung im Alter von 21 Tagen bei ihrer Leihmutter verblieben.

Zur Abgrenzung von uterinen und postnatalen Faktoren wurde eine neue Gruppe eingeführt, bei welcher NMRI-Blastozysten in C3H-Leihmütter transferiert und von diesen ausgetragen wurden. Am Tag nach der Geburt wurden die Jungtiere einer NMRI-Amme untergesetzt, sodass diese NMRI-Mäuse nur der uterinen Umwelt einer C3H-Mutter ausgesetzt waren, nicht aber deren postnatalen Effekten (Gruppe NMRI in C3H in NMRI).

### **5.1 Uterine Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen**

Durch den Vergleich der Gruppe NMRI in C3H in NMRI mit dem isogenen Transfer des Stammes NMRI (Gruppe NMRI in NMRI) konnten die uterinen Effekte auf das Verhalten des Nachwuchses ermittelt werden, da die Nachkommen beider Gruppen dieselbe genetische Abstammung und dieselbe postnatale Umwelt hatten, ihre pränatale Zeit jedoch in den Uteri von Rezipienten unterschiedlicher genetischer Herkunft verbrachten.

In der Motilitätsbox führte der Transfer in die uterine Umwelt einer C3H-Leihmutter zu einer signifikanten Reduktion der Zeit, welche der Nachwuchs mit Aufrichtverhalten verbrachte [ $t = -3,15$ ,  $df = 31,7$ ,  $p < 0,01$ ] und zu einer reduzierten Anzahl von Aufrichtungen [ $t = -3,32$ ,  $df = 31,7$ ,  $p < 0,01$ ] im Vergleich zum Transfer in die uterine Umwelt einer NMRI-Mutter, was durch einen t-Test gezeigt wurde (Abb.25a,b). Auch verbrachte der Nachwuchs von NMRI-Blastozysten, welche in den Uterus eines C3H-Rezipienten transferiert wurden, signifikant mehr Zeit im Zentrum der Box als der Nachwuchs des isogenen Transfers [ $t = 3,17$ ,  $df = 28,3$ ,  $p < 0,01$ ], was auf ein reduziertes Angstverhalten hinwies (Abb.25c). Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in der mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit lagen an der Signifikanzgrenze [ $t = 2,07$ ,  $df = 22$ ,  $p = 0,05$ ].

Auf dem EPM zeigte der Nachwuchs von NMRI-Blastozysten, welche in den Uterus einer C3H-Mutter transferiert wurden, signifikant weniger Eintritte in die offenen Arme des Maze als der Nachwuchs des isogenen Transfers [ $t = -2,48$ ,  $df = 28,7$ ,  $p = 0,02$ ] (Abb.25d). Der Verhaltensunterschied der Nachkommen beider Gruppen in der Anzahl der Eintritte in die

zentrale Plattform des Maze erreichte die Signifikanzgrenze nicht [ $t = -1,82$ ,  $df = 31,9$ ,  $p = 0,08$ ].

Der Transfer von NMRI-Blastozysten in den Uterus einer C3H-Mutter resultierte in einem signifikanten Anstieg der Amplitude der ASR beim Nachwuchs im Vergleich zu NMRI-Mäusen, welche ihre pränatale Zeit im Uterus von NMRI-Leihmüttern verbracht hatten [ $t = 5,74$ ,  $df = 17,3$ ,  $p < 0,001$  für B 1-2;  $t = 5,96$ ,  $df = 17,6$ ,  $p < 0,001$  für B 3-4 und  $t = 5,87$ ,  $df = 25$ ,  $p < 0,001$  für B 5-7] (Abb.25e). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei der „gesamten“ Sensitivierung dieses Reflexes durch die Fußschocks erreichte nicht die Signifikanzschwelle [ $t = 1,92$ ,  $df = 29,2$ ,  $p = 0,07$ ]. Hier führte der Transfer von NMRI-Blastozysten in den Uterus einer C3H-Mutter zu einer etwas stärkeren Sensitivierung dieses Reflexes bei den adulten Nachkommen (Abb.25f).

Für Details des t-Tests siehe Anhang Tab.10.

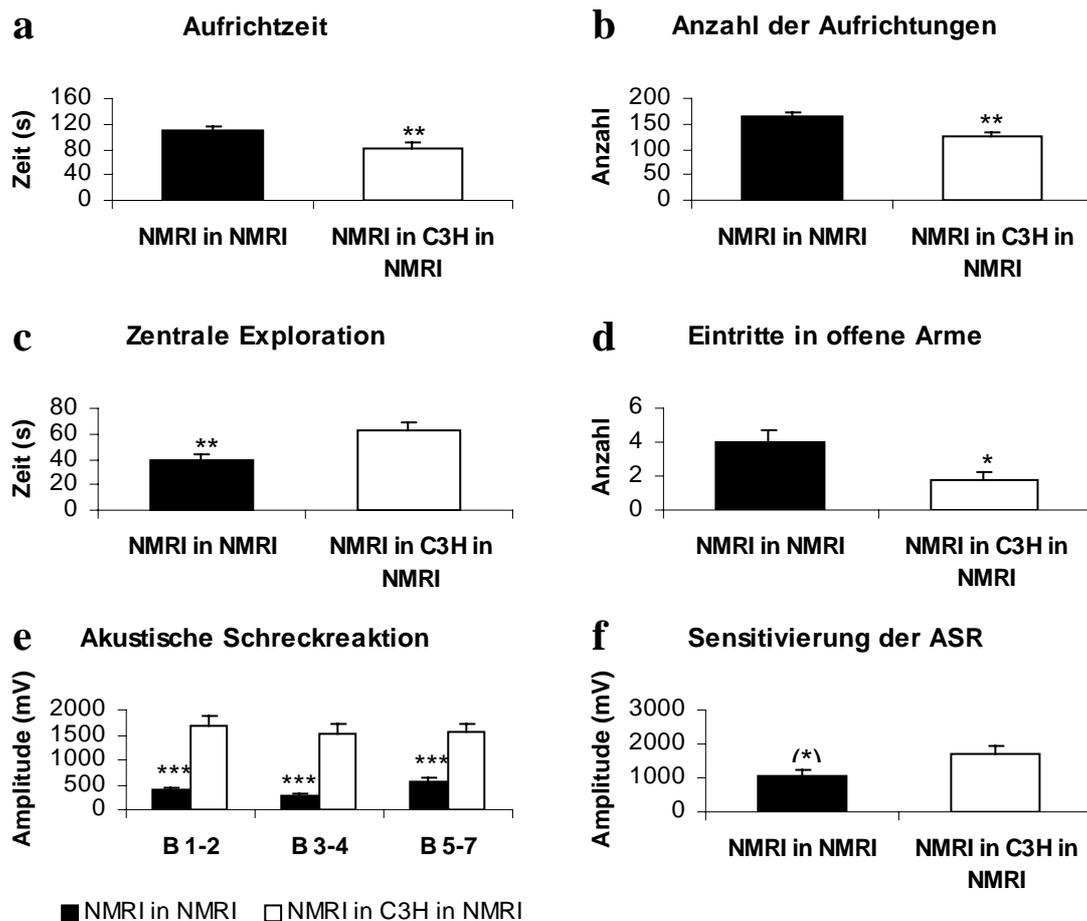


Abb.25. Uterine Effekte auf das Verhalten von NMRI-Mäusen.

Der Nachwuchs von NMRI-Blastozysten, welche in C3H-Leihmütter transferiert und nach der Geburt einer NMRI-Amme untergesetzt wurden, zeigte eine signifikante Reduktion in der durchschnittlich mit Aufrichtungen verbrachten Zeit (a) und in der durchschnittlichen Anzahl von Aufrichtungen (b) in der Motilitätsbox, verglichen mit dem isogenen Transfer. Diese Mäuse verbrachten auch mehr Zeit im Zentrum der Box (c). Auf dem EPM zeigten NMRI-Mäuse, welche ihre pränatale Zeit im Uterus einer C3H-Mutter verbrachten, signifikant weniger Eintritte in die offenen Arme des Maze im Vergleich zum isogenen Transfer (d). Sie wiesen auch eine höhere durchschnittliche Amplitude der ASR auf (e), jedoch erreichte der Anstieg in der „gesamten“ Sensitivierung der ASR nicht die Signifikanzschwelle (f).

(\*):  $p = 0,05-0,1$ ; \*:  $p < 0,05-0,01$ ; \*\*:  $p < 0,01-0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

## 5.2 Postnatale Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen

Postnatale Einflüsse auf das Verhalten des Nachwuchses wurden durch den Vergleich der Gruppe NMRI in C3H in NMRI mit der Transfergruppe NMRI in C3H ermittelt. Der Nachwuchs beider Gruppen hatte dieselbe genetische Abstammung und wuchs in derselben uterinen Umgebung auf, jedoch wurden die Neugeborenen der einer Gruppe von den C3H-Rezipienten aufgezogen, während die Neugeborenen der anderen Gruppe von einer NMRI-Mutter adoptiert wurden.

Der t-Test zeigte, dass die Adoption durch eine NMRI-Leihmutter zu einem signifikant längeren zurückgelegten Weg des Nachwuchses in der Motilitätsbox führte im Vergleich zu NMRI-Mäusen, welche bei ihrer C3H-Leihmutter verblieben [ $t = 2,61$ ,  $df = 21,9$ ,  $p = 0,02$ ] (Abb.26a). Weiterhin verbrachten NMRI-Mäuse, welche von einer NMRI-Leihmutter adoptiert wurden, eine signifikant geringere Zeit mit Aufrichtverhalten [ $t = -4,07$ ,  $df = 31,9$ ,  $p < 0,001$ ] und zeigten eine geringere Anzahl von Aufrichtungen [ $t = -4,12$ ,  $df = 31,5$ ,  $p < 0,001$ ] als NMRI-Mäuse, welche ihre postnatale Zeit in der Umwelt einer C3H-Mutter verbrachten (Abb.26b,c). Die Unterschiede der beiden Transfergruppen in der mit horizontaler Exploration verbrachten Zeit in der Motilitätsbox in den ersten 5 Minuten [ $t = 1,84$ ,  $df = 31,3$ ,  $p = 0,08$ ] und über den gesamten Testzeitraum hinweg [ $t = 1,77$ ,  $df = 26,9$ ,  $p = 0,09$ ] erreichten nicht die Signifikanzgrenze.

Bei den untersuchten Parametern des EPM wurden keine postnatalen Einflüsse auf das Verhalten des Nachwuchses gefunden.

Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, welche von NMRI-Leihmüttern aufgezogen wurden, eine signifikant höhere Amplitude der ASR im Vergleich mit Tieren, welche nach der Geburt bei ihren C3H-Müttern verblieben [ $t = 2,15$ ,  $df = 31,4$ ,  $p = 0,04$  für B 1-2;  $t = 3,26$ ,  $df = 28,3$ ,  $p < 0,01$  für B 3-4 und  $t = 2,86$ ,  $df = 31,9$ ,  $p < 0,01$  für B 5-7] (Abb.26d).

Für Details des t-Tests siehe Anhang Tab.10.

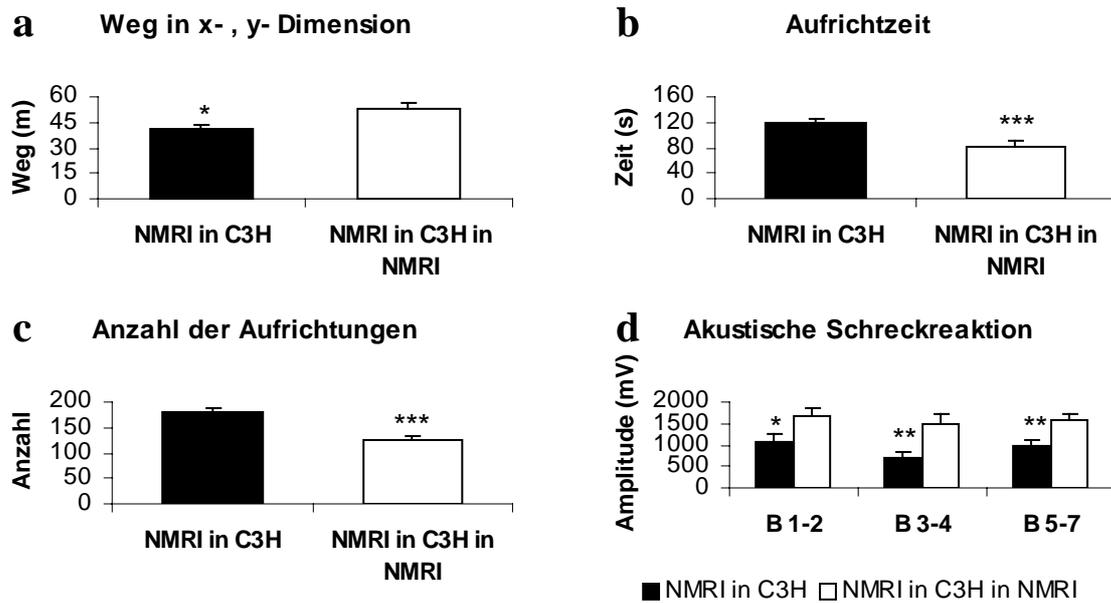


Abb.26. Postnatale Effekte auf das Verhalten von NMRI-Mäusen.

Die Nachkommen von NMRI-Blastozysten, welche in C3H-Leihmütter transferiert und nach der Geburt einer NMRI-Amme untergesetzt wurden, wiesen einen signifikant längeren durchschnittlichen Weg in der Motilitätsbox auf, verglichen mit Tieren, die bei der C3H-Leihmutter verblieben (a). Sie verbrachten auch eine geringere durchschnittliche Zeit mit Aufrichtverhalten (b) und zeigten eine geringere durchschnittliche Anzahl von Aufrichtungen (c). In der Furcht-sensitiven ASR wiesen die adoptierten Mäuse eine signifikant höhere durchschnittliche Amplitude der ASR auf (d).

\*:  $p < 0,05-0,01$ ; \*\*:  $p < 0,01-0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

### III. Immunhistochemische Untersuchungen

#### 1. Neuropeptid Y (NPY)

##### 1.1 Vorkommen NPY-immunpositiver Neurone in der Amygdala

Die meisten NPY-immunpositiven Neurone fanden sich im basolateralen Komplex (BLA) der Amygdala, wobei im basolateralen Nucleus (BL) etwas mehr Neurone immungefärbt waren als im lateralen Nucleus (L). Auch im basomedialen Kern der Amygdala (BM) waren NPY-immunpositive Neurone zu finden (siehe Tab.14 und Abb.27).

Im zentralen Kern (CeA) fanden sich NPY-immunpositive Zellen vor allem in der kapsulären Untereinheit (CeAc), da diese Zellen als ein Band vom Striatum herunterzogen und so vor allem im oberen Teil des zentralen Kerns vorkamen. Die medialen (CeAm) und lateralen (CeAl) Untereinheiten des zentralen Kerns wiesen deutlich weniger immungefärbte Neurone auf.

Die meisten immungefärbten Neuronen waren klein und bi- oder multipolar (Abb.27i). Im BLA waren diese vorwiegend an den Kerngrenzen lokalisiert.

##### 1.2 Vergleich der Stämme C3H und DBA

Morphologisch wurden nur die Gehirnschnitte der reziproken Transfers der Stämme C3H und DBA ausgewertet, da dies die ursprünglich interessierenden Mäusestämme waren.

Zum Vergleich der immunpositiven Zellzahlen der beiden Stämme in den verschiedenen Kerngebieten der Amygdala wurde ein t-Test durchgeführt (Tab.14).

Variable	Mittelwerte mit Standardfehlern		t-Test		
	DBA-Kontrolle (n = 6)	C3H-Kontrolle (n = 6)	df	t-Werte	p-Werte
NPY-BM	231,25 ± 10,25	255,75 ± 30,02	6,15	0,77	> 0,1
NPY-L	419,25 ± 34,99	445,50 ± 33,91	9,99	0,54	> 0,1
NPY-BL	544,25 ± 8,84	551,25 ± 38,02	5,54	0,18	> 0,1
NPY-BLA	1194,75 ± 48,73	1252,50 ± 92,89	7,56	0,55	> 0,1
NPY-CeAc	445,75 ± 19,64	545,50 ± 28,97	8,8	2,85	0,02
NPY-CeAm	83,00 ± 6,60	127,25 ± 24,49	5,72	1,74	> 0,1
NPY-CeAl	116,00 ± 21,93	115,25 ± 17,70	9,57	-0,03	> 0,1
NPY-CeA	644,75 ± 27,62	788,00 ± 62,32	6,89	2,10	0,07

Tab.14. Mittelwerte ± S.E.M. der Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakerengebieten der Mäusestämme C3H und DBA sowie Ergebnisse des t-Tests zum Vergleich der beiden Stämme.

rot = signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ ); gelb = p-Werte nahe der Signifikanzgrenze ( $p = 0,05$  bis  $p < 0,1$ )

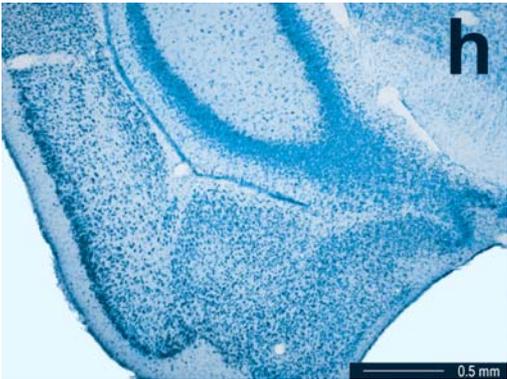
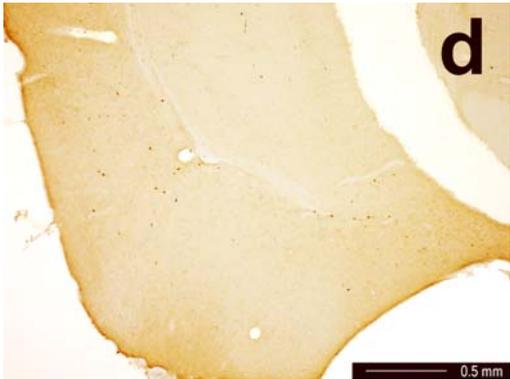
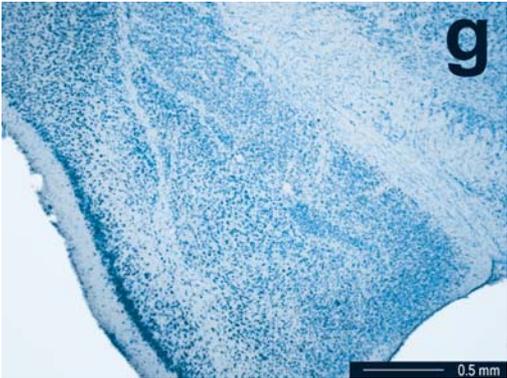
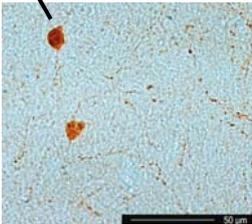
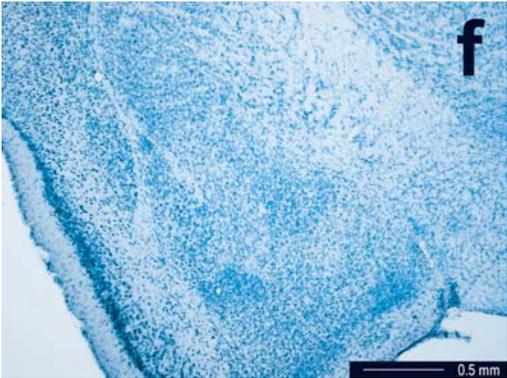
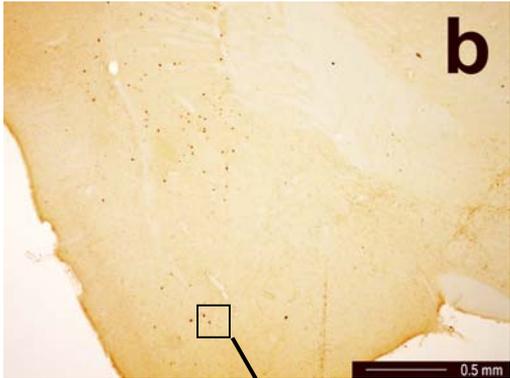
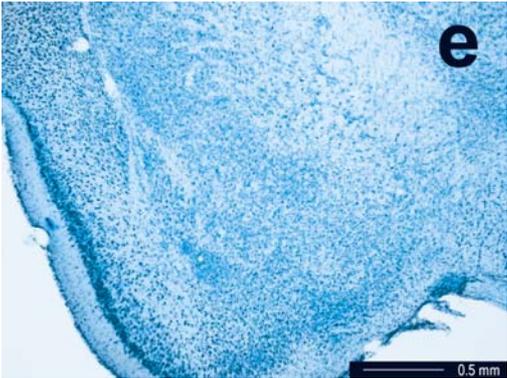
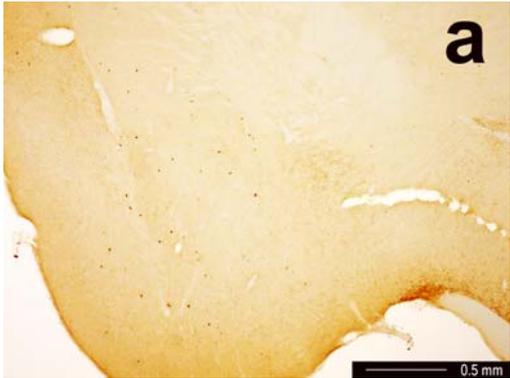


Abb.27. Verteilung von NPY-immunreaktiven Neuronen in der Amygdala der Maus.

Links dargestellt (a-d) sind die mit einem Antikörper gegen NPY immungefärbten Gehirnquerschnitte einer Maus der Transfergruppe DBA in C3H, rechts daneben die entsprechenden Nissl-Färbungen (e-h) zur anatomischen Lokalisation der Amygdala-Subregionen. Dargestellt wurden verschiedene rostrokaudale Ebenen der Amygdala. Die NPY-immunpositiven Neurone waren meist klein und bipolar (i).

Beim Vergleich der Amygdalakerengebiete der beiden Mäusestämme existierte nur ein signifikanter Unterschied in der Anzahl NPY-immunreaktiver Neurone im kapsulären Anteil des zentralen Kerns [ $t = 2,85$ ,  $df = 8,8$ ,  $p = 0,02$ ], wobei C3H-Tiere dort eine höhere Zellzahl aufwiesen. Im gesamten zentralen Kern erreichten die Unterschiede zwischen den beiden Stämmen nicht die Signifikanzgrenze [ $t = 2,10$ ,  $df = 6,89$ ,  $p = 0,07$ ] (Abb.28) und auch in den anderen Amygdalakernen wiesen die beiden Stämme keine signifikanten Unterschiede auf (Tab.14).

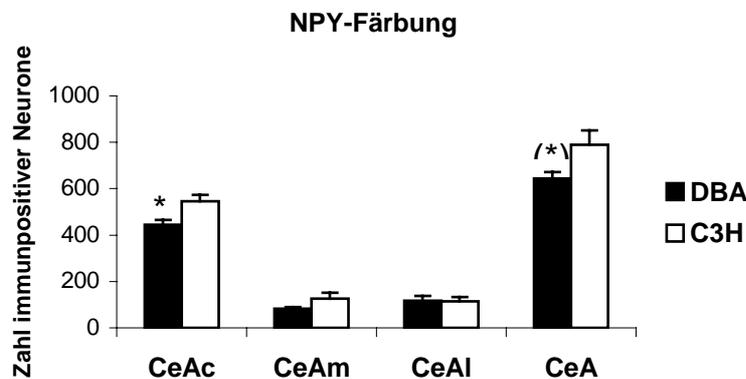


Abb.28. Anzahl NPY-immunpositiver Neurone im zentralen Kern der Amygdala sowie in den einzelnen Untereinheiten dieses Kerns in Gehirnschnitten der Mäusestämme C3H und DBA.

(\*):  $p = 0,05-0,1$ ; \*:  $p < 0,05-0,01$

### 1.3 Effekt der Transferprozedur

Die Effekte der Prozedur des Embrotransfers an sich wurden durch den Vergleich der unbehandelten Kontrolltiere eines jeden Stammes mit der zugehörigen isogenen Transfergruppe untersucht.

Bei Mäusen des Stammes C3H hatte der Embryotransfer keine signifikanten Auswirkungen auf die Anzahl NPY-immunreaktiver Neurone in den verschiedenen Kerngebieten der Amygdala, was durch einen t-Test gezeigt wurde.

Im Gegensatz dazu zeigten sich beim Stamm DBA signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrolltieren und den Nachkommen des isogenen Transfers in der Anzahl NPY-immunpositiver Zellen in fast allen Kerngebieten der Amygdala [ $t = -5,34$ ,  $df = 6,61$ ,

$p < 0,01$  für den basolateralen Komplex und  $t = -4,38$ ,  $df = 9,35$   $p < 0,01$  für den zentralen Kern], wobei die Prozedur des Embryotransfers zu einer Abnahme der Anzahl NPY-immunpositiver Neurone führte (Abb.29a). Im basolateralen Komplex waren der basomediale Kern [ $t = -5,81$ ,  $df = 9,93$ ,  $p < 0,001$ ] und der basolaterale Kern [ $t = -6,16$ ,  $df = 8,89$ ,  $p < 0,001$ ] am stärksten betroffen, jedoch fanden sich auch Unterschiede im lateralen Kern [ $t = -2,83$ ,  $df = 5,99$ ,  $p = 0,03$ ] (Abb.29b,c). Der kapsuläre Teil des zentralen Kerns wies als einzige Ausnahme keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl NPY-immunpositiver Zellen zwischen Nachkommen des isogenen Transfers und den unbehandelten Kontrolltieren auf, der mediale [ $t = -4,37$ ,  $df = 9,07$ ,  $p < 0,01$ ] und der laterale [ $t = -3,08$ ,  $df = 5,42$ ,  $p = 0,03$ ] Anteil zeigten jedoch ebenfalls eine signifikant reduzierte Anzahl immunpositiver Neurone bei Mäusen des isogenen Transfers (Abb.29d).

Für Mittelwerte und Standardabweichungen der beiden Gruppen siehe Anhang Tab.11.

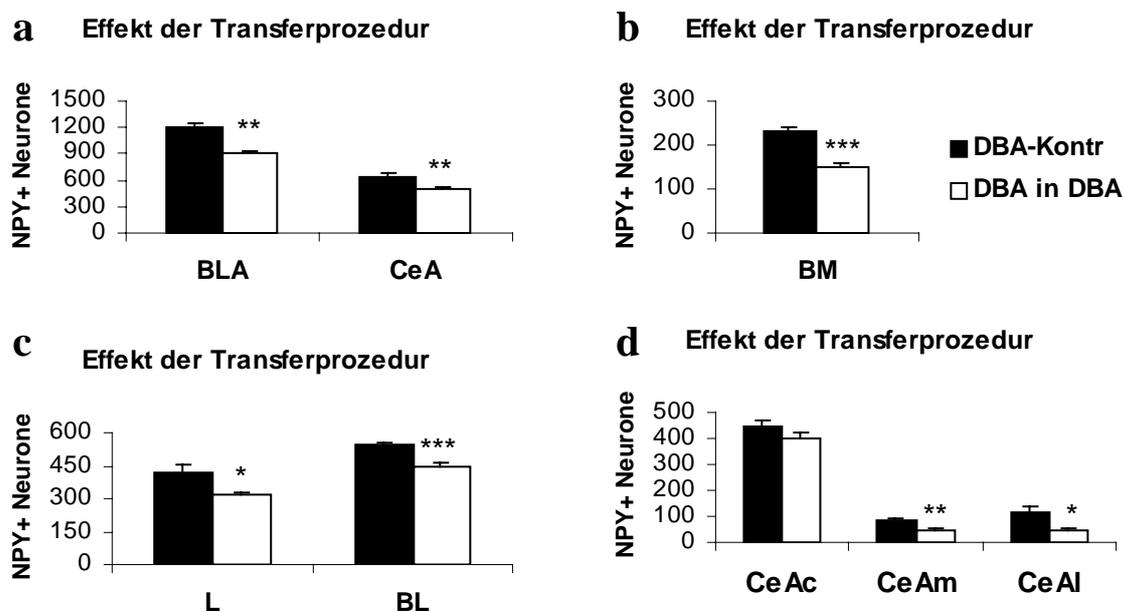


Abb.29. Signifikante Effekte des Embryotransfers auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den Amygdalakerengebieten des Stammes DBA. Die Transferprozedur führte in fast allen Amygdalakernen zu einer reduzierten Anzahl immunpositiver Neurone. a) basolateraler Komplex und zentraler Kern b) basomedialer Kern c) lateraler und basolateraler Kern d) Untereinheiten des zentralen Kerns \*:  $p < 0,05-0,01$ ; \*\*:  $p < 0,01-0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

### 1.4 Vergleich der isogenen Transfers der beiden Stämme

Da sich aufgrund des Embryotransfer die Anzahl NPY-immunpositiver Zellen in fast allen Amygdalakernen des Stammes DBA vermindert hatten, wiesen die beiden isogenen Transfergruppen (C3H in C3H und DBA in DBA) nun andere Unterschiede auf als die unbehandelten Kontrolltiere.

Der durchgeführte t-Test zeigte, dass die Anzahl NPY-immunpositiver Zellen im basomedialen Kern der Amygdala bei Nachkommen des isogenen Transfers des Stammes C3H signifikant höher war als beim Nachwuchs des isogenen Transfers des Stammes DBA [ $t = 3,55$ ,  $df = 7,1$ ,  $p < 0,01$ ] (Abb.30a). Auch im lateralen Kern der Amygdala wies die isogene Transfergruppe des C3H-Stammes eine signifikant höhere Anzahl immunpositiver Zellen auf [ $t = 2,62$ ,  $df = 6,01$ ,  $p = 0,04$ ], im basolateralen Kern existierte jedoch weiterhin kein Unterschied zwischen den Nachkommen der isogenen Transfers der beiden Stämme (Abb.30b). Der Unterschied im gesamten basolateralen Komplex erreichte die Signifikanzgrenze [ $t = 2,97$ ,  $df = 5,76$ ,  $p = 0,03$ ] (Abb.30c).

Dies war auch im zentralen Kern der Fall [ $t = 7,23$ ,  $df = 8,11$ ,  $p < 0,001$ ], wobei signifikante Unterschiede in allen Untereinheiten dieses Kerns gefunden wurden [ $t = 4,85$ ,  $df = 9,57$ ,  $p < 0,001$  für den kapsulären Anteil;  $t = 3,67$ ,  $df = 5,81$ ,  $p = 0,01$  für den medialen Anteil und  $t = 3,73$ ,  $df = 5,42$ ,  $p = 0,01$  für den lateralen Anteil] (Abb.30c,d).

Eine Tabelle der Ergebnisse des t-Tests befindet sich im Anhang (Tab.12).

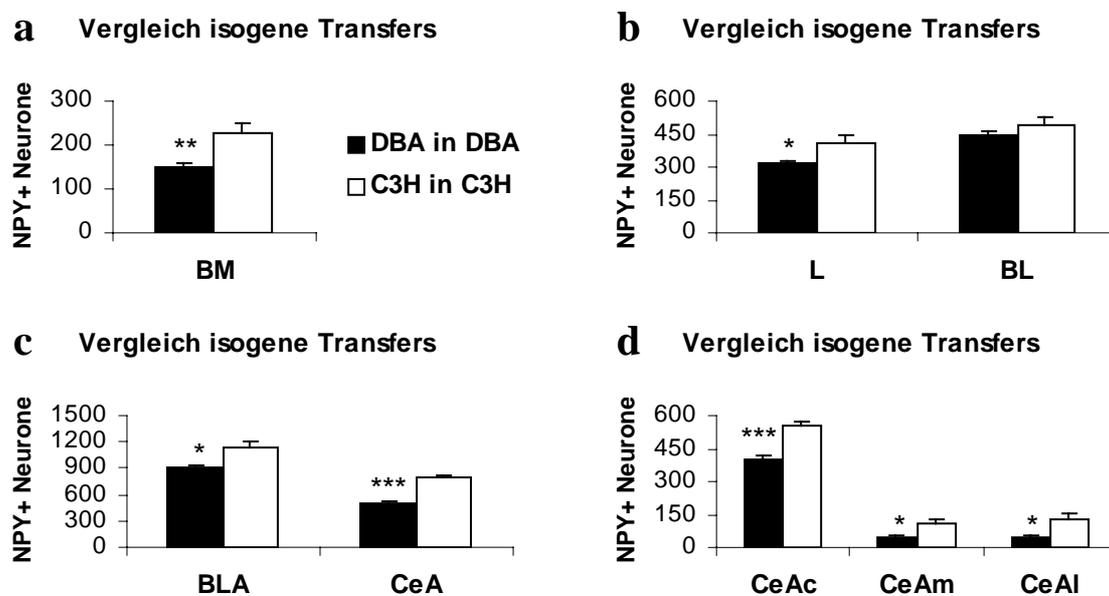


Abb.30. Vergleich der Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den Kerngebieten der Amygdala zwischen den isogenen Transfergruppen der Stämme C3H und DBA. Nachkommen des isogenen Transfers des Stammes C3H wiesen in fast allen Kerngebieten der Amygdala höhere Zellzahlen auf. a) basomedialer Kern b) lateraler und basolateraler Kern c) basolateraler Komplex und zentraler Kern d) Untereinheiten des zentralen Kerns ; \* :  $p < 0,05-0,01$ ; \*\* :  $p < 0,01-0,001$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$

## 1.5 Wechselseitiger Transfer der Stämme C3H und DBA

Durch die reziproken Embryotransfers zwischen den beiden Mäusestämmen wurden vier Transfergruppen erhalten, bei welchen die Bestimmung der NPY-immunpositiven Neuronen in den Amygdalakernen erfolgte:

C3H in C3H

C3H in DBA

DBA in DBA

DBA in C3H

### 1.5.1 Drei-faktorielle Varianzanalyse

Zur allgemeinen Übersicht wurde mit den Ergebnissen der Zellzählung bei den Nachkommen der reziproken Transfers der Stämme C3H und DBA eine drei-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Embryo-Donatoren (genetische Effekte), Embryo-Rezipienten (maternale Effekte) und Geschlecht durchgeführt (Tab.15).

#### a) genetische Effekte

Ein signifikanter Einfluss der genetischen Abstammung der Embryonen auf die Anzahl NPY-immunreaktiver Neurone wurde sowohl im zentralen Kern [ $F = 63,16$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$ ] als auch im basolateralen Komplex [ $F = 5,64$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,03$ ] festgestellt.

Im zentralen Kern war die Anzahl immunpositiver Zellen in allen Untereinheiten signifikant von der genetischen Herkunft der Embryonen abhängig [ $F = 45,88$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$  für den kapsulären Anteil;  $F = 25,33$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$  für den medialen Anteil und  $F = 10,16$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,01$  für den lateralen Anteil].

Auch im basomedialen [ $F = 15,86$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,01$ ] und im lateralen Kern [ $F = 7,69$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,01$ ] hatten genetische Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl NPY-immunreaktiver Neurone, die einzige Ausnahme bildete der basolaterale Kern, wo kein genetischer Einfluss festgestellt werden konnte.

#### b) maternale Effekte

Ein signifikanter Einfluss der genetischen Herkunft der Rezipienten auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone wurde im basomedialen Kern der Amygdala festgestellt [ $F = 5,08$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,04$ ]. Im zentralen Kern erreichte dieser nicht die Signifikanzschwelle [ $F = 3,14$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,09$ ].

## c) Wechselwirkungen zwischen genetischen und maternalen Effekten

Eine signifikante Wechselwirkung zwischen der genetischen Herkunft der Donatoren und derjenigen der Rezipienten auf die Anzahl immunpositiver Zellen wurde nur im basolateralen Komplex gefunden [ $F = 6,34$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,02$ ], wobei diese Wechselwirkung im lateralen Kern signifikant war [ $F = 6,26$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,02$ ], im basolateralen Kern hingegen an der Signifikanzgrenze lag [ $F = 4,34$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,05$ ].

## d) Geschlecht

Ein signifikanter Einfluss des Geschlechtes der Nachkommen auf die Zahl der NPY-immunpositiven Neurone in den verschiedenen Kerngebieten der Amygdala konnte nicht nachgewiesen werden. Einzig in den kapsulären und medialen Anteilen des zentralen Kerns lag der Einfluss des Geschlechtes an der Signifikanzgrenze [ $F = 3,70$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,07$  für den kapsulären Anteil und  $F = 4,34$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,05$  für den medialen Anteil], wobei männliche Nachkommen eine etwas höhere Anzahl immunpositiver Zellen aufwiesen.

## e) Wechselwirkungen zwischen genetischen/maternalen Effekten und Geschlecht

Es wurde keinerlei Wechselwirkung zwischen der genetischen Herkunft der Embryonen und dem Geschlecht der Tiere auf die Anzahl NPY-immunreaktiver Neurone in den verschiedenen Kernen der Amygdala gefunden, ebenso gab es keine Wechselwirkungen zwischen maternalen Faktoren und dem Geschlecht.

Variable	Geschlecht df = 1	Donatoren df = 1	Rezipienten df = 1	Donatoren × Rezipienten df = 1	Donatoren × Geschlecht df = 1	Rezipienten × Geschlecht df = 1
NPY-BM	$F=0,79$ $p > 0,1$	$F=15,86$ $p < 0,01$	$F=5,08$ $p = 0,04$	$F=1,99$ $p > 0,1$	$F=2,88$ $p > 0,1$	$F=0,16$ $p > 0,1$
NPY-L	$F=0,04$ $p > 0,1$	$F=7,69$ $p = 0,01$	$F=0,00$ $p > 0,1$	$F=6,26$ $p = 0,02$	$F=0,51$ $p > 0,1$	$F=0,26$ $p > 0,1$
NPY-BL	$F=0,54$ $p > 0,1$	$F=0,52$ $p > 0,1$	$F=0,08$ $p > 0,1$	$F=4,34$ $p = 0,05$	$F=0,33$ $p > 0,1$	$F=0,60$ $p > 0,1$
NPY-BLA	$F=0,02$ $p > 0,1$	$F=5,64$ $p = 0,03$	$F=0,31$ $p > 0,1$	$F=6,34$ $p = 0,02$	$F=0,10$ $p > 0,1$	$F=0,33$ $p > 0,1$
NPY-CeAc	$F=3,70$ $p = 0,07$	$F=45,88$ $p < 0,001$	$F=0,43$ $p > 0,1$	$F=0,34$ $p > 0,1$	$F=1,29$ $p > 0,1$	$F=1,49$ $p > 0,1$
NPY-CeAm	$F=4,34$ $p = 0,05$	$F=25,33$ $p < 0,001$	$F=0,90$ $p > 0,1$	$F=1,14$ $p > 0,1$	$F=1,12$ $p > 0,1$	$F=0,38$ $p > 0,1$
NPY-CeAl	$F=2,22$ $p > 0,1$	$F=10,16$ $p < 0,01$	$F=2,99$ $p > 0,1$	$F=0,79$ $p > 0,1$	$F=0,05$ $p > 0,1$	$F=0,65$ $p > 0,1$
NPY-CeA	$F=1,12$ $p > 0,1$	$F=63,16$ $p < 0,001$	$F=3,14$ $p = 0,09$	$F=1,60$ $p > 0,1$	$F=0,92$ $p > 0,1$	$F=0,01$ $p > 0,1$

Tab.15. Ergebnisse der drei-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Embryo-Donatoren, Embryo-Rezipienten und Geschlecht für die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen des Nachwuchses der reziproken Embryotransfers der Stämme C3H und DBA.  $df$  = Anzahl der Freiheitsgrade; rot = signifikante  $p$ -Werte ( $p < 0,05$ ); gelb =  $p$ -Werte nahe der Signifikanzgrenze ( $p = 0,05$  bis  $p < 0,1$ )

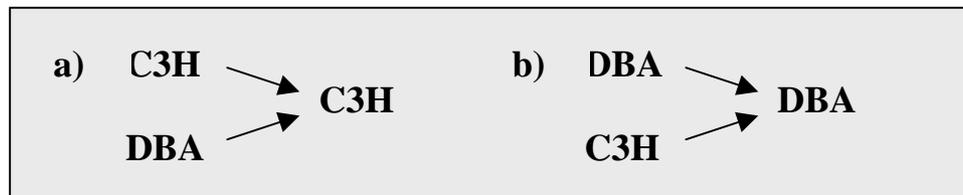
### 1.5.2 Einzelergebnisse der wechselseitigen Transfers

Zur Bestimmung des Einflusses maternaler und genetischer Faktoren auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den Amygdalakerengebieten der beiden Mäusestämme wurden jeweils zwei Transfergruppen mit Hilfe von t-Tests verglichen.

Für Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Transfergruppen siehe Anhang Tab.13, für Details der Ergebnisse der t-Tests siehe Anhang Tab.14.

#### 1.5.2.1 Bestimmung von genetischen Einflüssen

Genetische Einflüsse auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den Amygdalakernen des Nachwuchses wurden durch den Vergleich der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in Leihmütter des selben Stammes untersucht. Diese Analyse wurde sowohl für C3H- als auch für DBA-Leihmütter durchgeführt.



#### a) Transfer von C3H- und DBA-Blastozysten in C3H-Rezipienten

Der Vergleich der Transfergruppen C3H in C3H und DBA in C3H zeigte signifikante genetische Effekte auf die Anzahl NPY-immunreaktiver Neurone im zentralen Kern der Amygdala [ $t = 4,36$ ,  $df = 9,75$ ,  $p < 0,01$ ]. Hierbei führte der Transfer von C3H-Embryonen zu signifikant höheren Zellzahlen im kapsulären Teil des zentralen Kerns [ $t = 4,19$ ,  $df = 9,92$ ,  $p < 0,01$ ] im Vergleich zum Transfer von DBA-Embryonen. Die Unterschiede der beiden Transfergruppen im medialen Anteil des Kerns erreichten die Signifikanzgrenze nicht [ $t = 2,15$ ,  $df = 6,51$ ,  $p = 0,07$ ] (Abb.31).

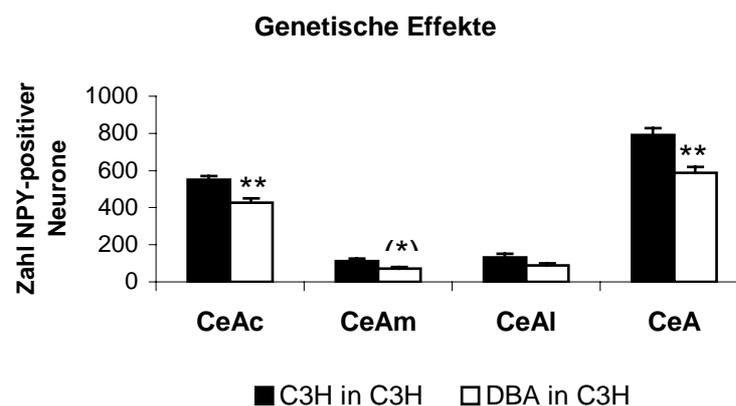


Abb.31. Genetische Einflüsse auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone im zentralen Kern der Amygdala beim Transfer in C3H-Leihmütter.

(\*):  $p = 0,05-0,1$ ; \*\*:  $p < 0,01-0,001$

*b) Transfer von C3H- und DBA-Blastozysten in DBA-Rezipienten*

Wurden C3H-Embryonen in DBA-Leihmütter transferiert, so zeigten die Nachkommen im zentralen Kern [ $t = 7,86$ ,  $df = 9,08$ ,  $p < 0,001$ ] und im basolateralen Komplex [ $t = 4,28$ ,  $df = 5,56$ ,  $p < 0,01$ ] eine signifikant höhere Anzahl NPY-immunpositiver Neurone als beim Transfer von DBA-Blastozysten (Abb.32a).

Einzig die Unterschiede in der Anzahl NPY-immunpositiver Neurone im basolateralen Kern erreichte die Signifikanzgrenze nicht [ $t = 2,13$ ,  $df = 5,54$ ,  $p = 0,08$ ], während sich die beiden Transfergruppen im basomedialen Kern [ $t = 5,29$ ,  $df = 9,9$ ,  $p < 0,001$ ] und im lateralen Kern [ $t = 5,59$ ,  $df = 6,33$ ,  $p < 0,01$ ] signifikant unterschieden (Abb.32b,c).

Im zentralen Kern war die Anzahl immunpositiver Zellen in allen Untereinheiten signifikant von der genetischen Herkunft der Embryonen abhängig [ $t = 4,99$ ,  $df = 9,15$ ,  $p < 0,001$  für den kapsulären Anteil;  $t = 4,92$ ,  $df = 6,47$ ,  $p < 0,01$  für den medialen Anteil und  $t = 2,66$ ,  $df = 5,32$ ,  $p = 0,04$  für den lateralen Anteil] (Abb.32d).

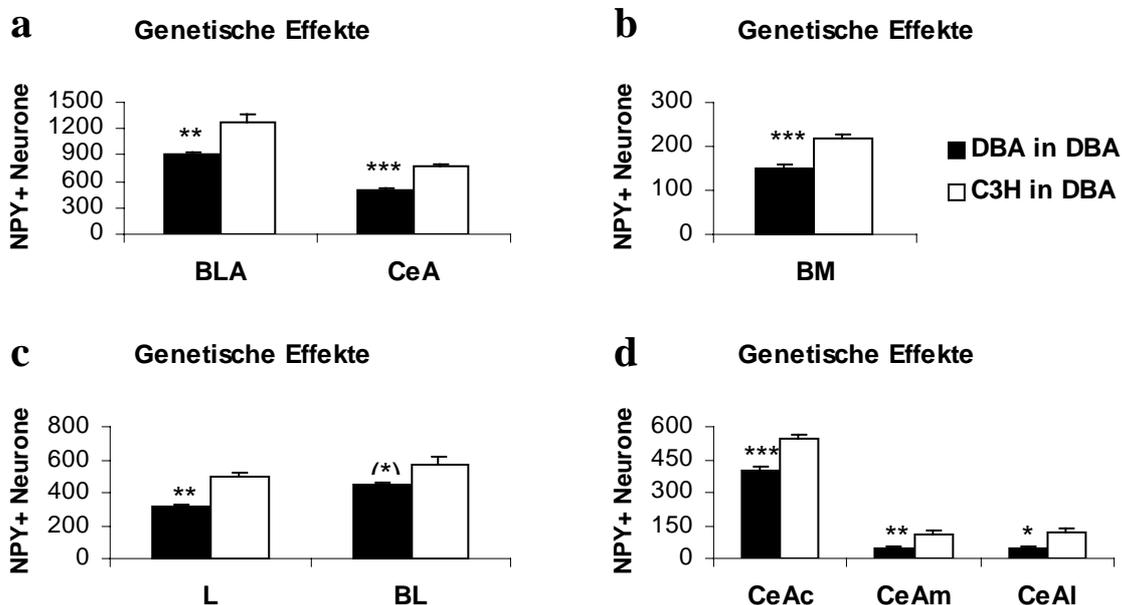
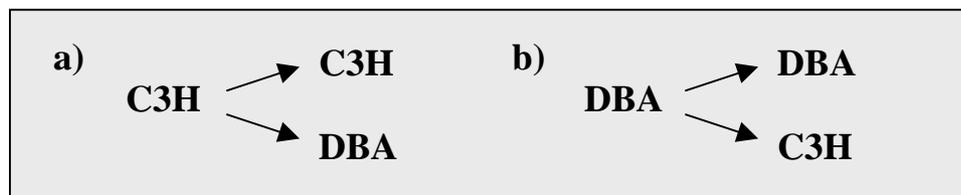


Abb.32. Genetische Einflüsse auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen beim Transfer in DBA-Leihmütter. a) basolateraler Komplex und zentraler Kern b) basomedialer Kern c) lateraler und basolateraler Kern d) Untereinheiten des zentralen Kerns

(\*):  $p = 0,05-0,1$ ; \*:  $p < 0,05-0,01$ ; \*\*:  $p < 0,01-0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

### 1.5.2.2 Bestimmung von maternalen Einflüssen

Maternale Einflüsse auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den Amygdalakerengebieten der Nachkommen wurden durch den Vergleich der Transfers von genetisch identischen Blastozysten in C3H- und DBA-Leihmütter untersucht. Dies wurde sowohl für C3H- als auch für DBA-Blastozysten durchgeführt.



#### *a) Transfer von C3H-Embryonen in C3H- und DBA-Rezipienten*

Der t-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transfergruppen C3H in C3H und C3H in DBA in der Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Kernen der Amygdala. Im lateralen Kern erreichten die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht die Signifikanzgrenze [ $t = -1,84$ ,  $df = 9,82$ ,  $p < 0,1$ ].

#### *b) Transfer von DBA-Embryonen in C3H- und DBA-Rezipienten*

Der Transfer von DBA-Blastozysten in C3H-Leihmütter führte bei den Nachkommen zu einer signifikant höheren Anzahl NPY-immunpositiver Neurone im basolateralen Komplex [ $t = 2,87$ ,  $df = 5,68$ ,  $p = 0,03$ ] und im zentralen Kern [ $t = 2,59$ ,  $df = 8,92$ ,  $p = 0,03$ ] im Vergleich zum Transfer in DBA-Leihmütter (Abb.33a), wie der durchgeführte t-Test zeigte.

Im basolateralen Komplex existierten jedoch nur signifikante Unterschiede zwischen den beiden Transfergruppen im basomedialen Kern [ $t = 2,35$ ,  $df = 8,89$ ,  $p = 0,04$ ], die maternalen Einflüsse auf die Anzahl immunpositiver Zellen im lateralen und basolateralen Kern lagen an der Signifikanzgrenze [ $t = 2,19$ ,  $df = 5,82$ ,  $p = 0,07$  für den lateralen Kern und  $t = 2,43$ ,  $df = 6,09$ ,  $p = 0,05$  für den basolateralen Kern] (Abb.33b,c).

Die Unterschiede der beiden Transfergruppen im zentralen Kern beruhten auf signifikanten maternalen Effekten in den medialen und lateralen Anteilen des Kerns [ $t = 3,11$ ,  $df = 9,14$ ,  $p = 0,01$  für den medialen Anteil des Kerns und  $t = 3,10$ ,  $df = 6,32$ ,  $p = 0,02$  für den lateralen Anteil des Kerns], im kapsulären Teil existierten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb.33d).

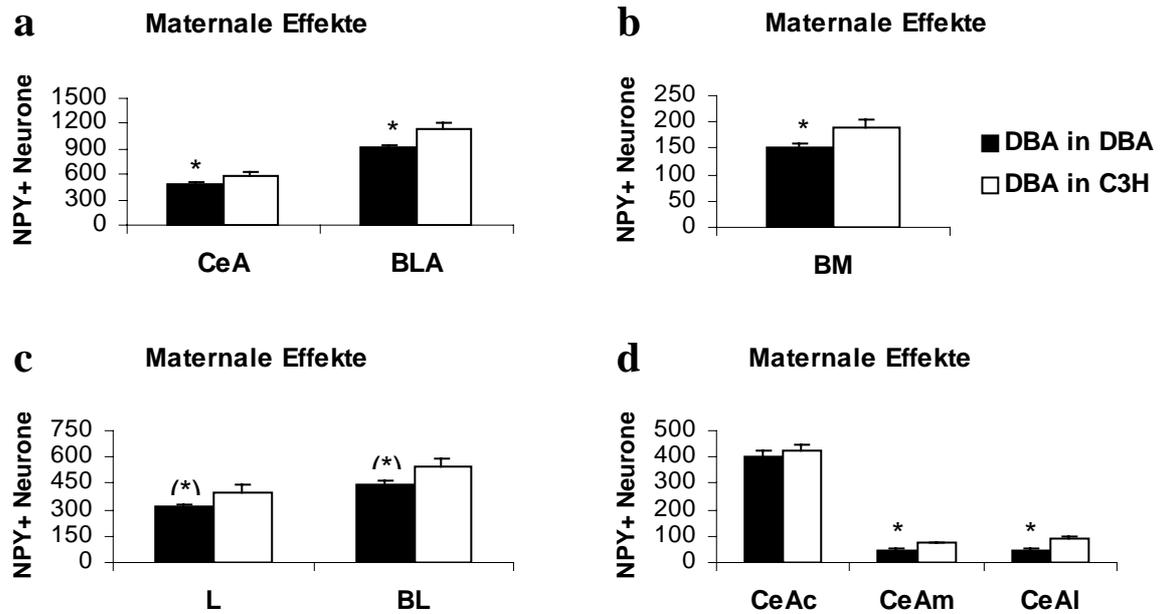


Abb.33. Maternale Einflüsse auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakerengebieten von DBA-Mäusen. a) zentraler Kern und basolateraler Komplex b) basomedialer Kern c) lateraler und basolateraler Kern d) Untereinheiten des zentralen Kerns (\*):  $p = 0,05-0,1$ ; \*\*:  $p < 0,05-0,01$

## 2. Parvalbumin (PARV)

### 2.1 Vorkommen PARV-immunpositiver Neurone in der Amygdala

PARV-immunpositive Neurone fanden sich in der Amygdala vor allem im basolateralen Komplex (BLA), wobei diese im basolateralen Kern (BL) zahlreicher waren als im lateralen Kern (L). Auch im basomedialen Kern der Amygdala (BM) existierte eine beträchtliche Anzahl immunpositiver Neurone, wohingegen der zentrale Kern (CeA) vergleichsweise wenige immungefärbte Zellen aufwies. Dort waren die meisten immunpositiven Zellen im kapsulären Anteil des Kerns (CeAc) zu finden, wohingegen diese in der lateralen Unter-einheit (CeAl) recht selten anzutreffen waren (siehe Abb.34 und Tab.16).

Die meisten PARV-immunpositiven Zellen waren multipolare Neurone von mittlerer Größe (Abb.34).

### 2.2 Vergleich der Stämme C3H und DBA

Mit den ermittelten Mittelwerten und den zugehörigen Standardfehlern der Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakerengebieten der beiden Ausgangsstämme wurde ein t-Test zum Vergleich der Stämme durchgeführt (Tab.16).

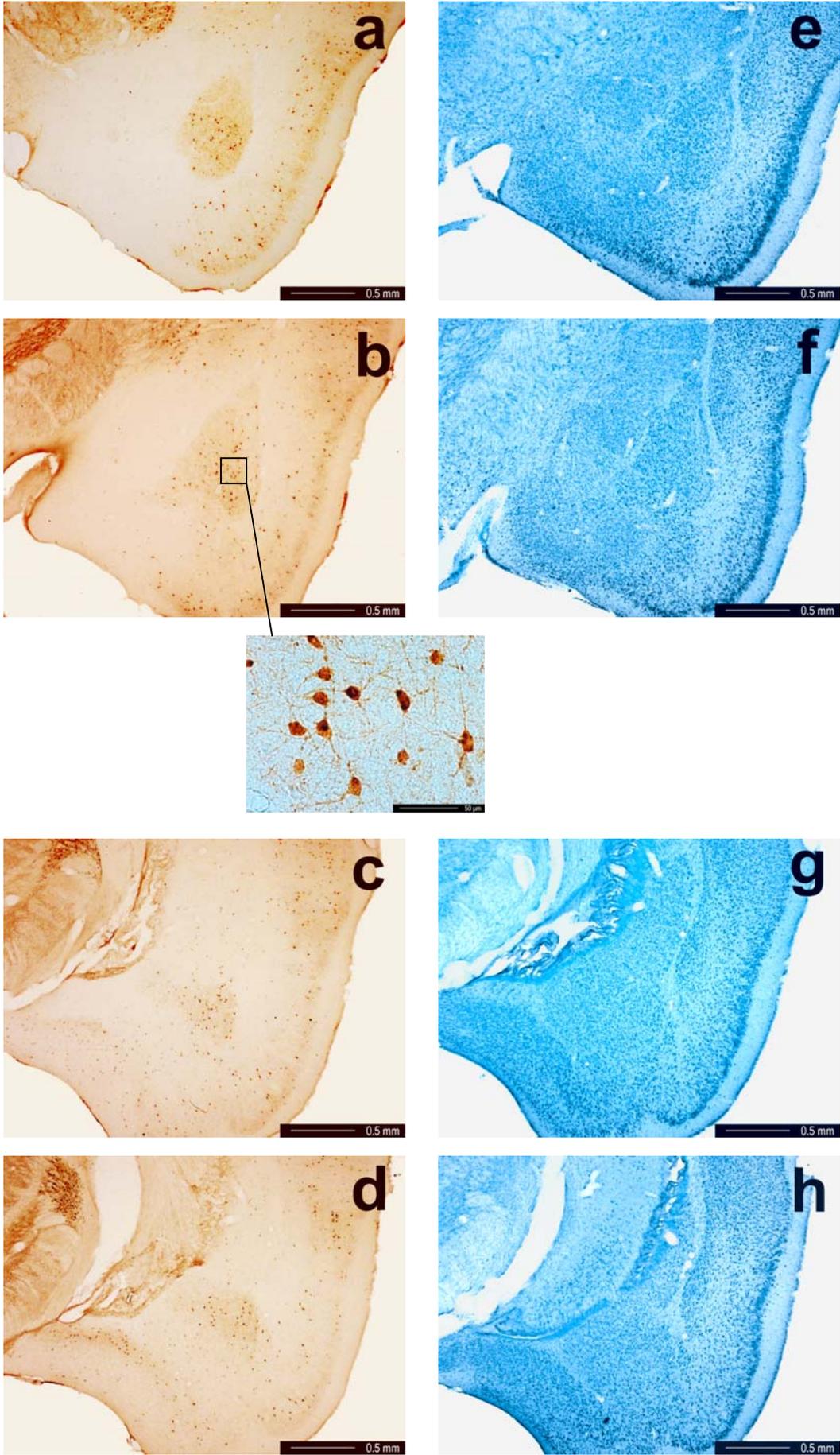
Variable	Mittelwerte mit Standardfehlern		t-Test		
	DBA-Kontrolle (n = 6)	C3H-Kontrolle (n = 6)	df	t-Werte	p-Werte
PARV-BM	1220,50 ± 52,40	1017,75 ± 57,32	9,92	-2,61	0,03
PARV-L	1629,75 ± 97,36	1190,50 ± 69,99	9,08	-3,66	< 0,01
PARV-BL	5314,50 ± 241,88	4898,50 ± 286,40	9,73	-1,11	> 0,1
PARV-BLA	8164,75 ± 340,24	7106,75 ± 342,80	10,0	-2,19	0,05
PARV-CeAc	182,75 ± 13,01	143,50 ± 15,29	9,75	-1,96	0,08
PARV-CeAm	110,75 ± 7,71	96,25 ± 12,21	8,44	-1,00	> 0,1
PARV-CeAl	38,00 ± 7,17	23,00 ± 2,97	6,66	-1,93	< 0,1
PARV-CeA	331,50 ± 20,28	262,75 ± 20,71	10,0	2,37	0,04

Tab.16. Mittelwerte ± S.E.M. der Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakerengebieten der Mäusestämme C3H und DBA sowie Ergebnisse des t-Tests zum Vergleich der beiden Stämme.

rot = signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ ); gelb = p-Werte nahe der Signifikanzgrenze ( $p = 0,05$  bis  $p < 0,1$ )

Abb.34. Verteilung von PARV-immunreaktiven Neuronen in der Amygdala der Maus.

Links dargestellt (a-d) sind die mit einem Antikörper gegen Parvalbumin immungefärbten Gehirnquerschnitte einer Maus der Transfergruppe DBA in DBA, rechts daneben die entsprechenden Nissl-Färbungen (e-h) zur anatomischen Lokalisation der Amygdala-Subregionen. Dargestellt wurden verschiedene rostrokale Ebenen der Amygdala. Die PARV-immunpositiven Neurone waren multipolar (i).



Der durchgeführte t-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen C3H und DBA bei der Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone im basomedialen [t = -2,61, df = 9,92, p = 0,03] und lateralen Kern der Amygdala [t = -3,66, df = 9,08, p < 0,01], wobei DBA-Tiere eine höhere Anzahl immunpositiver Neurone aufwiesen als C3H-Mäuse (Abb.35a,b). Die beiden Mäusestämme unterschieden sich jedoch nicht signifikant in der Anzahl immunpositiver Zellen im basolateralen Kern, sodass der Unterschied im gesamten basolateralen Komplex an der Signifikanzgrenze lag [t = -2,19, df = 10,0, p = 0,05] (Abb.35b). Auch im zentralen Kern der Amygdala wiesen DBA-Tiere eine höhere Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone auf als Mäuse des Stammes C3H [t = -2,37, df = 10,0, p = 0,04]. Dieser Unterschied zwischen den beiden Stämmen war auf etwas unterschiedliche Zellzahlen im kapsulären und lateralen Anteil zurückzuführen, welche allerdings die Signifikanzgrenze nicht erreichten [t = -1,96, df = 9,75, p = 0,08 für die kapsuläre Untereinheit und t = -1,93, df = 6,66, p < 0,1 für die laterale Untereinheit] (Abb.35c).

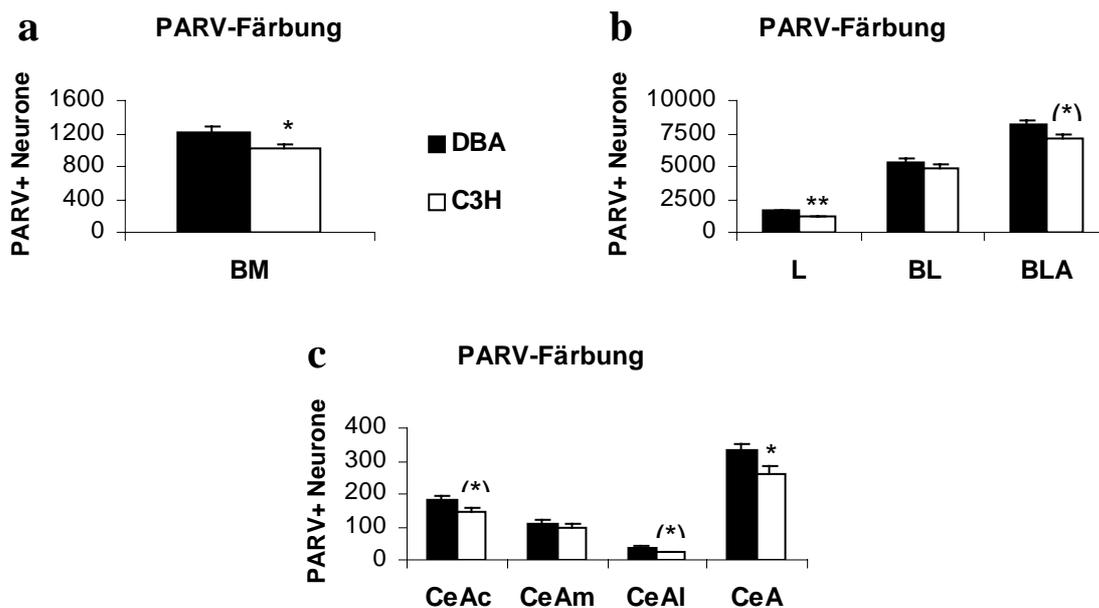


Abb.35. Anzahl der PARV-immunpositiven Neurone in den Kerngebieten der Amygdala bei den Mäusestämmen C3H und DBA. a) basomedialer Kern b) lateraler und basolateraler Kern, sowie gesamter basolateraler Komplex c) zentraler Kern mit seinen Untereinheiten.

(\*): p = 0,05-0,1; \*: p < 0,05-0,01; \*\*: p < 0,01-0,001

### 2.3 Effekt der Transferprozedur

Durch den Vergleich der unbehandelten Kontrolltiere eines jeden Stammes mit der zugehörigen isogenen Transfergruppe wurden wieder die Effekte des Embryotransfers an sich untersucht. Ein Effekt der Transferprozedur wurde nur beim Inzuchtstamm C3H festgestellt, wo der durchgeführte t-Test bei Nachkommen des isogenen Transfers eine signifikant geringere Anzahl PARV-immunpositiver Neurone im basolateralen Kern der Amygdala zeigte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren [ $t = -2,60$ ,  $df = 9,97$ ,  $p = 0,03$ ] (Abb.36a). Im basomedialen und lateralen Kern waren keine Effekte der Transferprozedur feststellbar, jedoch überschritten die Unterschiede der beiden Gruppen im gesamten basolateralen Komplex ebenfalls die Signifikanzgrenze [ $t = -2,84$ ,  $df = 9,45$ ,  $p = 0,02$ ] (Abb.36b). Für Mittelwerte der isogenen Transfergruppen und detaillierte Ergebnisse des t-Tests siehe Anhang Tab.15.

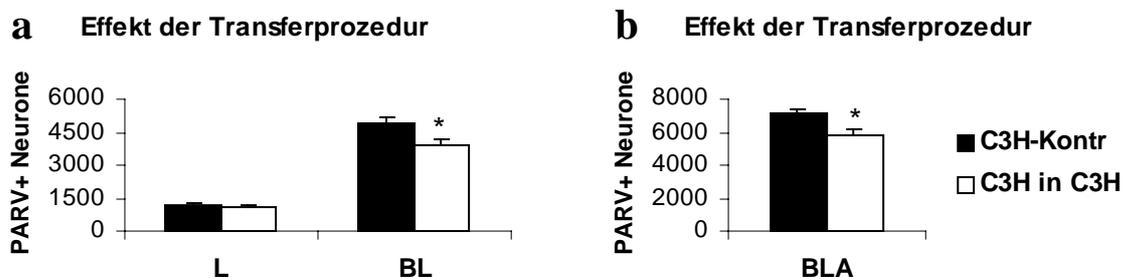


Abb.36. Effekt der Prozedur des Embryotransfers auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone im basolateralen Komplex der Amygdala des Stammes C3H. Der Embryotransfer führte dort zu einer reduzierten Anzahl immunpositiver Neurone. a) lateraler und basolateraler Kern b) gesamter basolateraler Komplex

\*:  $p < 0,05-0,01$

### 2.4 Vergleich der isogenen Transfers der beiden Stämme

Aufgrund des Effekts des Embryotransfers auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone des Stammes C3H, wiesen die beiden isogenen Transfergruppen (C3H in C3H und DBA in DBA) nun andere Unterschiede auf als die unbehandelten Kontrolltiere.

Bei der isogenen Transfergruppe des Stammes DBA wurden nun sowohl im lateralen [ $t = -3,65$ ,  $df = 7,03$ ,  $p < 0,01$ ] als auch im basolateralen Kern [ $t = -2,27$ ,  $df = 9,98$ ,  $p < 0,05$ ] der Amygdala signifikant höhere Zellzahlen festgestellt als bei der isogenen Transfergruppe des Stammes C3H, wie der durchgeführte t-Test zeigte (Abb.37a). Im basomedialen Kern existierten keine Unterschiede zwischen den Nachkommen der beiden isogenen Transfers, die Zellzahlen im gesamten basolateralen Komplex unterschieden sich jedoch signifikant

[ $t = -3,12$ ,  $df = 8,52$ ,  $p = 0,01$ ] (Abb.37b).

Auch im kapsulären Teil des zentralen Kerns zeigte der Nachwuchs des isogenen Transfers des Stammes DBA eine signifikant höhere Anzahl immunreaktiver Neurone als Nachkommen der Transfergruppe C3H in C3H [ $t = -2,34$ ,  $df = 8,59$ ,  $p < 0,05$ ], die Unterschiede im gesamten zentralen Kern erreichten die Signifikanzgrenze nicht [ $t = -2,07$ ,  $df = 9,65$ ,  $p = 0,07$ ] (Abb.37c).

Für detaillierte Ergebnisse des t-Tests zum Vergleich der isogenen Transfers der beiden Stämme siehe Anhang Tab.16.

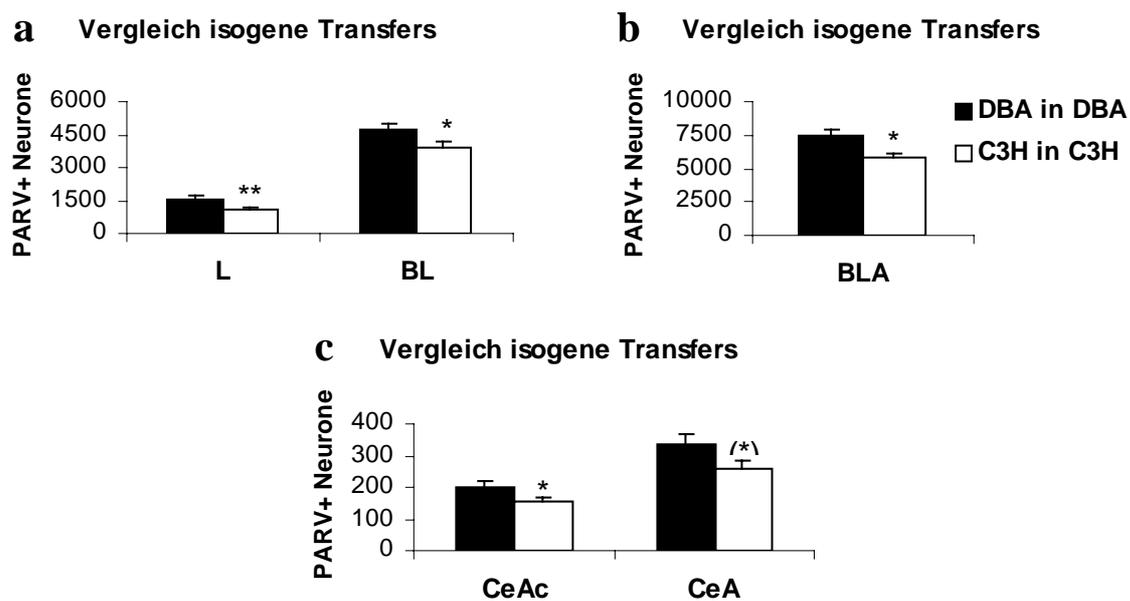


Abb.37. Vergleich der Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den Kerngebieten der Amygdala zwischen den Nachkommen der isogenen Transfers der Stämme C3H und DBA. a) lateraler und basolateraler Kern b) basolateraler Komplex c) kapsulärer Anteil des zentralen Kerns und gesamter zentraler Kern.

(\*):  $p = 0,05-0,1$ ; \*:  $p < 0,05-0,01$ ; \*\*:  $p < 0,01-0,001$

## 2.5 Wechselseitiger Transfer der Stämme C3H und DBA

### 2.5.1 Drei-faktorielle Varianzanalyse

Mit den ermittelten Zellzahlen der PARV-immunreaktiven Neurone in den verschiedenen Kerngebieten der Amygdala bei Nachkommen der reziproken Transfers der Stämme C3H und DBA wurde eine drei-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Embryo-Donatoren (genetische Effekte), Embryo-Rezipienten (maternale Effekte) und Geschlecht durchgeführt (Tab.17).

#### a) genetische Effekte

Es existierte ein signifikanter genetischer Einfluss auf die Anzahl PARV-immunreaktiver Zellen im basolateralen Komplex [ $F = 8,98$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,01$ ], wobei sowohl die Zellzahlen im lateralen [ $F = 10,75$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,01$ ] als auch im basolateralen Kern [ $F = 5,30$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,03$ ] signifikant von der genetischen Herkunft der Embryonen abhängig waren. Einzig im basomedialen Kern hatte die genetische Herkunft der Embryonen keinerlei Einfluss auf die Anzahl PARV-immunpositiver Zellen.

Weiterhin wurde die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone im zentralen Kern signifikant von der genetischen Herkunft der Embryonen beeinflusst [ $F = 20,59$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$ ]. Dort waren signifikante genetische Effekte in den kapsulären und lateralen Anteilen des Kerns zu finden [ $F = 17,00$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$  für den kapsulären Anteil und  $F = 4,47$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,05$  für den lateralen Anteil], der Effekt im medialen Anteil erreichte jedoch nicht die Signifikanzschwelle [ $F = 3,56$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,08$ ].

#### b) maternale Effekte

Es wurden keine signifikanten Einflüsse der genetischen Herkunft der Rezipienten auf die Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone in den Kerngebieten der Amygdala festgestellt. Nur im lateralen Kern lag der maternale Einfluss auf die Anzahl immunpositiver Zellen nahe der Signifikanzgrenze [ $F = 4,20$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,06$ ].

#### c) Wechselwirkungen zwischen genetischen und maternalen Effekten

Eine signifikante Wechselwirkung zwischen der genetischen Herkunft der Embryonen und derjenigen der Rezipienten auf die Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone wurde nur im basomedialen Kern der Amygdala gefunden [ $F = 6,60$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,02$ ], die Wechselwirkung im gesamten basolateralen Komplex erreichte nicht die Signifikanzgrenze [ $F = 3,37$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,09$ ].

#### d) Geschlecht

Es existierte keinerlei Einfluss des Geschlechtes der Nachkommen auf die Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone in den untersuchten Kerngebieten der Amygdala.

#### e) Wechselwirkungen zwischen genetischen/maternalen Effekten und Geschlecht

Wechselwirkungen zwischen der genetischen Herkunft der Embryonen oder derjenigen der Rezipienten und dem Geschlecht der Tiere auf die Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen wurden nicht gefunden.

Variable	Geschlecht df = 1	Donatoren df = 1	Rezipienten df = 1	Donatoren × Rezipienten df = 1	Donatoren × Geschlecht df = 1	Rezipienten × Geschlecht df = 1
PARV-BM	F=0,01 p > 0,1	F=1,46 p > 0,1	F=0,99 p > 0,1	F=6,60 p = 0,02	F=0,10 p > 0,1	F=0,04 p > 0,1
PARV-L	F=0,09 p > 0,1	F=10,75 p < 0,01	F=4,20 p = 0,06	F=0,12 p > 0,1	F=1,52 p > 0,1	F=0,60 p > 0,1
PARV-BL	F=0,24 p > 0,1	F=5,30 p = 0,03	F=0,45 p > 0,1	F=2,46 p > 0,1	F=1,44 p > 0,1	F=0,52 p > 0,1
PARV-BLA	F=0,02 p > 0,1	F=8,98 p < 0,01	F=1,20 p > 0,1	F=3,37 p = 0,09	F=0,75 p > 0,1	F=0,22 p > 0,1
PARV-CeAc	F=0,67 p > 0,1	F=17,00 p < 0,001	F=0,47 p > 0,1	F=0,00 p > 0,1	F=0,11 p > 0,1	F=0,58 p > 0,1
PARV-CeAm	F=0,04 p > 0,1	F=3,56 p = 0,08	F=0,29 p > 0,1	F=0,43 p > 0,1	F=1,38 p > 0,1	F=1,40 p > 0,1
PARV-CeAl	F=0,69 p > 0,1	F=4,47 p < 0,05	F=0,25 p > 0,1	F=0,63 p > 0,1	F=0,22 p > 0,1	F=2,18 p > 0,1
PARV-CeA	F=0,84 p > 0,1	F=20,59 p < 0,001	F=0,39 p > 0,1	F=0,38 p > 0,1	F=0,14 p > 0,1	F=2,89 p > 0,1

Tab.17. Ergebnisse der drei-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Embryo-Donatoren, Embryo-Rezipienten und Geschlecht für die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen der Nachkommen der reziproken Embryotransfers der Stämme C3H und DBA. df = Anzahl der Freiheitsgrade  
rot = signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ )  
gelb = p-Werte nahe der Signifikanzgrenze ( $p = 0,05$  bis  $p < 0,1$ )

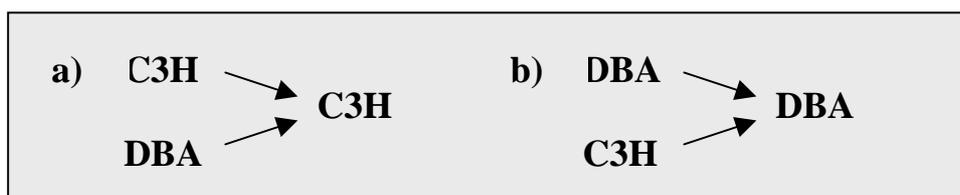
### 2.5.2 Einzelergebnisse der wechselseitigen Transfers

Zur Bestimmung des Einflusses maternaler und genetischer Faktoren auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den Amygdalakerngebieten der beiden Mäusestämme wurden jeweils zwei Transfergruppen mit Hilfe von t-Tests verglichen.

Für Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Transfergruppen siehe Anhang Tab.17, für Details der Ergebnisse der t-Tests siehe Anhang Tab.18.

#### 2.5.2.1 Bestimmung von genetischen Einflüssen

Genetische Einflüsse auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den Amygdalakernen des Nachwuchses wurden durch den Vergleich der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in Leihmütter des selben Stammes untersucht. Diese Analyse wurde sowohl für C3H- als auch für DBA-Leihmütter durchgeführt.



a) Transfer von C3H- und DBA-Blastozysten in C3H-Rezipienten

Der Transfer von DBA-Blastozysten in C3H-Leihmütter führte bei den Nachkommen zu einer signifikant höheren Anzahl von PARV-immunreaktiven Neuronen im basomedialen [t = -2,80, df = 9,96, p = 0,02], im lateralen [t = -3,43, df = 8,14, p < 0,01] und im basolateralen Kern [t = -2,34, df = 9,91, p = 0,04], verglichen mit dem Transfer von C3H-Blastozysten (Abb.38a,b). Somit waren auch die Zellzahlen im gesamten basolateralen Komplex signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Transfergruppen [t = -3,66, df = 9,01, p < 0,01] (Abb.38b).

Auch im zentralen Kern zeigte der Nachwuchs des Transfer von DBA-Blastozysten in C3H-Rezipienten eine signifikant höhere Anzahl PARV-immunreaktiver Zellen als die Nachkommen des isogenen Transfers [t = -2,87, df = 8,64, p = 0,02], jedoch konnte dieser Unterschied nur im kapsulären Anteil des Kerns gefunden werden [t = -3,56, df = 9,32, p < 0,01], nicht jedoch in den medialen und lateralen Anteilen (Abb.38c).

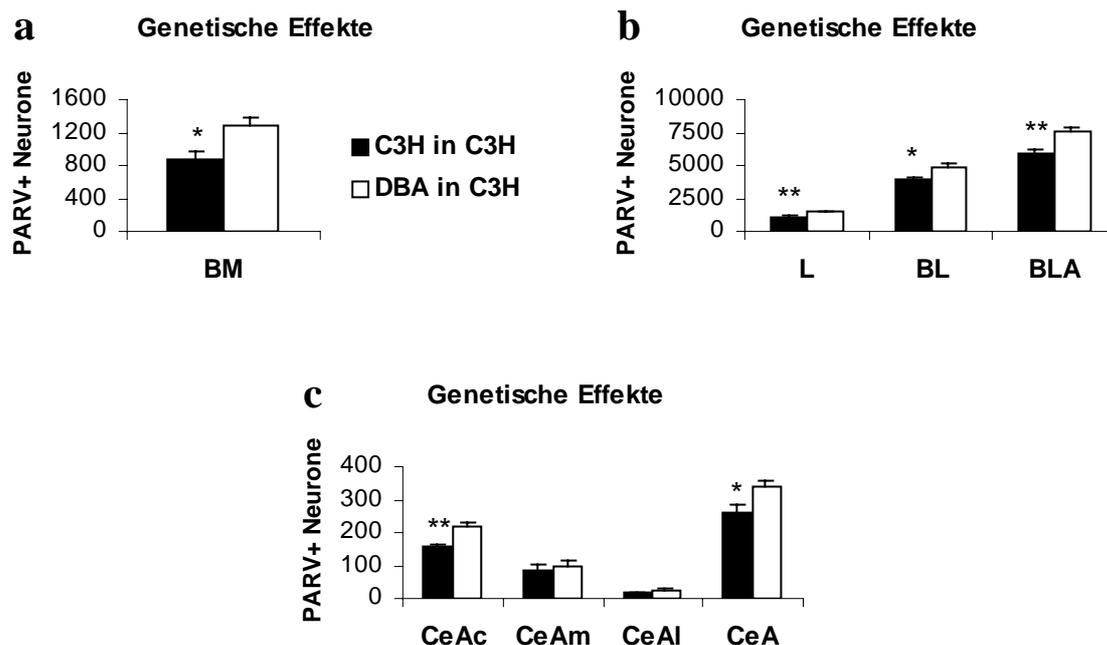


Abb.38. Genetische Einflüsse auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen beim Transfer in C3H-Leihmütter. a) basomedialer Kern b) lateraler und basolateraler Kern, sowie gesamter basolateraler Komplex c) zentraler Kern mit seinen Untereinheiten

\*: p < 0,05-0,01; \*\*: p < 0,01-0,001

### b) Transfer von C3H- und DBA-Blastozysten in DBA-Rezipienten

Der Transfer von C3H-Blastozysten in DBA-Leihmütter führte bei den Nachkommen zu einer signifikant geringeren Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone im zentralen Kern als der Transfer von DBA-Blastozysten [t = -3,09, df = 8,42, p = 0,01] (Abb.39a). Die Unterschiede der Transfergruppen machten sich in den kapsulären und medialen Anteilen des Kerns bemerkbar [t = -2,56, df = 9,76, p = 0,03 für den kapsulären Anteil und t = -2,28, df = 9,61, p < 0,05 für den medialen Anteil], im lateralen Anteil des zentralen Kerns existierten keine genetischen Einflüsse auf die Anzahl immunpositiver Neurone (Abb.39b).

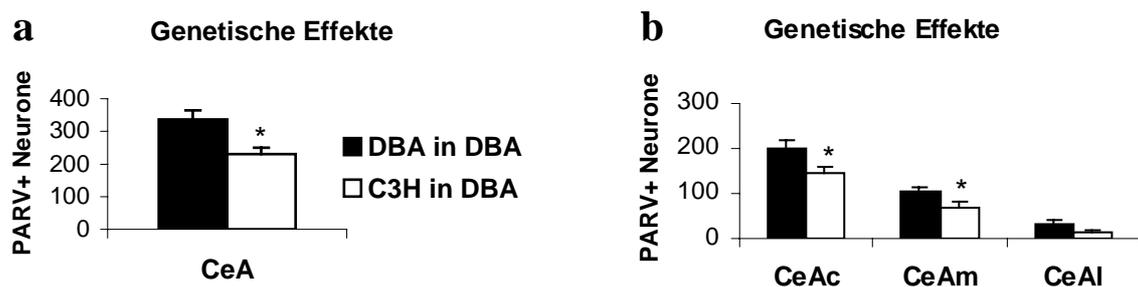
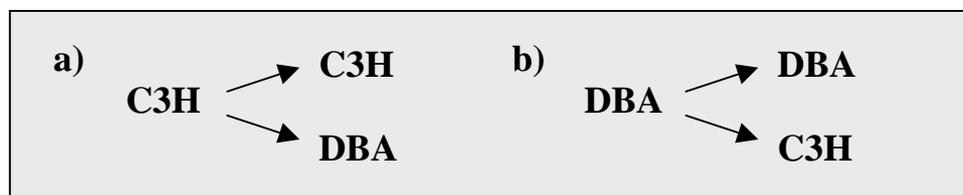


Abb.39. Genetische Einflüsse auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone im zentralen Kern der Amygdala beim Transfer in DBA-Leihmütter. a) gesamter zentraler Kern b) Untereinheiten des zentralen Kerns; \*: p < 0,05 bis p = 0,01

#### 2.5.2.2 Bestimmung von maternalen Einflüssen

Maternale Einflüsse auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den Amygdalakerengebieten der Nachkommen wurden durch den Vergleich der Transfers von genetisch identischen Blastozysten in C3H- und DBA-Leihmütter untersucht. Dies wurde sowohl für C3H- als auch für DBA-Blastozysten durchgeführt.



### a) Transfer von C3H-Blastozysten in C3H- und DBA-Rezipienten

Die drei-faktorielle ANOVA zeigte nur einen maternalen Einfluss auf die Anzahl von PARV-immunpositiven Neuronen im lateralen Kern der Amygdala, welcher die Signifikanzschwelle nicht erreichte [F = 4,20, df = 1, p = 0,06].

Die anschließend durchgeführten ein-faktoriellen ANOVAs ergaben jedoch signifikante maternale Einflüsse auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone beim Transfer von C3H-Blastozysten in C3H- und DBA-Rezipienten. Dort führte der Transfer von C3H-Blastozysten in DBA-Leihmütter zu einer signifikant höheren Anzahl von PARV-immunpositiven Zellen im basolateralen Komplex [ $t = -3,36$ ,  $df = 8,79$ ,  $p < 0,01$ ] des Nachwuchses im Vergleich zum isogenen Transfer (Abb.40b). Der maternale Einfluss auf die Anzahl immunpositiver Neurone im BLA kam durch signifikante Unterschiede der beiden Transfergruppen im lateralen Kern [ $t = -2,42$ ,  $df = 9,2$ ,  $p = 0,04$ ] und im basomedialen Kern [ $t = -3,20$ ,  $df = 8,5$ ,  $p = 0,01$ ] zustande, im basolateralen Kern hingegen lagen keine signifikanten maternalen Einflüsse vor (Abb.40a,b).

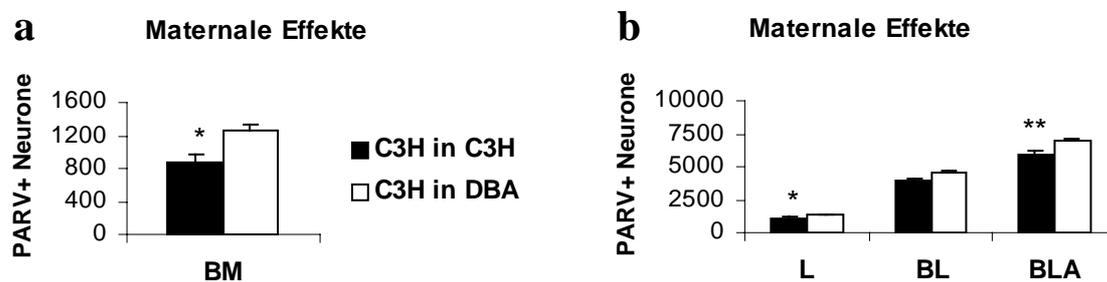


Abb.40. Maternale Einflüsse auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone im basolateralen Komplex von C3H-Mäusen. a) basomedialer Kern b) lateraler und basolateraler Kern sowie gesamter basolateraler Komplex

\*:  $p < 0,05-0,01$

#### b) Transfer von DBA-Blastozysten in C3H- und DBA-Rezipienten

Bei Nachkommen von DBA-Blastozysten wurden keine maternalen Einflüsse auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen gefunden.

## **D. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des Embryotransfers benutzt, um genetische und maternale Einflüsse auf die Expression des Angstverhaltens und die Anzahl Parvalbumin (PARV)- und Neuropeptid Y (NPY)-immunreaktiver Neurone in den Amygdalakerengebieten des Nachwuchses dreier Mäusestämme zu untersuchen.

Die beiden Inzuchtstämme C3H und DBA wurden ausgewählt, da sie signifikante Unterschiede in der Furcht-sensitiven akustischen Schreckreaktion (ASR) aufweisen, wobei C3H-Tiere als „ängstlich“ und DBA-Tiere als „nicht ängstlich“ gelten. Da jedoch bekannt war, dass DBA-Mäuse schlechte Rezipienten für Embryonen sind (persönliche Kommunikation Prof. Dr. Herbert Schwegler, Institut für Anatomie, Universität Magdeburg und Frank Zimmermann, Zentrales Tierlabor, Universität Heidelberg) und unklar war, ob die Transfers in diesen Mäusestamm gelingen würden, wurde der Auszuchtstamm NMRI in das Transferschema mit einbezogen, da dieser oft als Rezipient für die kommerzielle Sanierung von Tieren verwendet wird. Mit diesen drei Mäusestämmen wurden reziproke Embryotransfers durchgeführt.

Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die Prozedur des Embryotransfers an sich hatte weitreichende Effekte auf das Verhalten und die Amygdalamorphologie der Nachkommen.
- 2) Das Verhalten des Nachwuchses wurde vorwiegend von genetischen Faktoren determiniert. Maternale Einflüsse wurden auf das Aufrichtverhalten und die Amplitude der ASR bei Nachkommen aller drei Stämme gefunden, beim Auszuchtstamm NMRI wurden weitere maternale Effekte in allen Verhaltenstests ermittelt.
- 3) Ein nachfolgender Jungenaustausch beim Auszuchtstamm NMRI zeigte, dass uterine Faktoren das Verhalten der Nachkommen entsprechend dem Verhalten des Leihmutter-stammes veränderten. Agierten sowohl uterine als auch postnatale Faktoren am selben Verhaltensparameter, so wirkten diese in entgegengesetzte Richtungen.
- 4) Die Amygdalamorphologie wurde vorwiegend vom genetischen Hintergrund der Nachkommen bestimmt. Stammesabhängige maternale Einflüsse wurden nur auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone gefunden.

## **1. Erfolg des Embryotransfers**

Trotz anderslautender Prognosen ist erstmals der Transfer von Embryonen in Leihmütter des Stammes DBA gelungen. Die drei verwendeten Mäusestämme unterschieden sich jedoch deutlich in der Effizienz des Embryotransfers. Bei Mäusen des Stammes DBA gab es beträchtliche Probleme beim Auslösen der Superovulation. Der Östruszyklus der Weibchen ließ sich nur schwer synchronisieren, das heißt, es wurden nur wenige Weibchen mit einem Vaginalpropf erhalten. Da dieser Stamm auch schlecht züchtete und deshalb nicht ausreichend Embryo-Donatoren zur Verfügung standen, mussten die Weibchen mehrmals nacheinander superovuliert werden. Es ist bekannt, dass signifikante genetische Unterschiede in der ovulatorischen Antwort von Mäusen auf Gonadotropinen bestehen (Rall, 2000; Spearow und Barkley, 1999; Spearow et al., 1999; Roudebush und Duralia, 1996) und auch *Van Keuren und Saunders* (2004) berichteten über Probleme bei der Superovulation mit dem Stamm DBA/2J.

Die Schwangerschaftsraten der verschiedenen Transfergruppen waren in erster Linie vom Zeitpunkt des Transfers abhängig und in der ersten Versuchshälfte aufgrund geringerer technischer Fähigkeiten etwas niedriger. Die durchschnittliche Schwangerschaftsrate über den gesamten Versuchszeitraum betrug 58,73%. Zwischen den verschiedenen Transfergruppen gab es keine bedeutenden Unterschiede in den Schwangerschaftsraten.

In tragenden Weibchen überlebten 35,8% der Blastozysten bis zur Geburt und 29,53% konnten abgesetzt werden. Die Überlebensrate der transferierten Blastozysten war sowohl von der genetischen Herkunft der Blastozysten als auch von der genetischen Herkunft der Rezipienten abhängig. Embryonen des Stammes NMRI hatten die höchsten Überlebensraten, unabhängig von der maternalen Umwelt, wohingegen der Transfer von DBA-Embryonen zu den niedrigsten Überlebensraten in Rezipienten aller drei Stämme führte. Auch zeigten Embryonen, welche in DBA-Leihmütter transferiert wurden, eine deutlich geringere Überlebensrate als beim Transfer in Rezipienten der anderen beiden Stämme, der Transfer in NMRI-Leihmütter führte hingegen zu den besten Ergebnissen. Der isogene Transfer des Stammes DBA bereitete deshalb die meisten Schwierigkeiten, jedoch war auch der Transfer von C3H-Embryonen in Rezipienten des Stammes DBA nicht ganz unproblematisch. Bei diesen beiden Transfergruppen überlebten nur relativ wenige Blastozysten bis zur Geburt und von diesen verstarb die Hälfte in der postnatalen Periode. Insgesamt zeigte sich, dass der Auszuchtstamm NMRI sowohl als Embryo-Donator als auch als Embryo-Rezipient die höchsten Erfolgsraten beim Embryotransfer lieferte, wohingegen der Inzuchtstamm DBA am wenigsten für diese Prozedur geeignet war, vor allem nicht als Embryo-Rezipient.

Der Einfluss der genetischen Herkunft der Embryonen auf die Überlebensrate beim Embryotransfer wurde auch in anderen Studien gezeigt (Chin und Wang, 2001; Ernst et al., 2000) und auch *van Keuren und Saunders* (2004) berichteten über Probleme bei der Sanierung des Stammes DBA/2J aufgrund geringer Geburtenraten nach dem Embryotransfer. Auch ist bekannt, dass die uterine maternale Umwelt das Überleben und die Entwicklung der transferierten Embryonen beeinflusst (Ernst et al., 2000; Pomp et al., 1989; Moore et al., 1970). Bei Verwendung von Hybridstämmen als Embryo-Rezipienten entwickelt sich ein höherer Prozentsatz von transferierten Embryonen erfolgreich, verglichen mit Inzucht-Rezipienten (Chin und Wang, 2001; Bulman-Fleming und Wahlsten, 1988).

Der isogene Transfer des Stammes DBA bereitete in dieser Studie die meisten Probleme und auch in anderen Studien wurde beschrieben, dass der Transfer von Embryonen zwischen demselben Stamm weniger erfolgreich war als der Transfer in einen anderen Stamm (Ernst et al., 2000; Moore et al., 1970). Dies steht jedoch im Gegensatz zum isogenen Transfer des Stammes NMRI, welcher die besten Schwangerschafts- und Überlebensraten lieferte.

Die erreichten Erfolgsraten beim Embryotransfer waren mit denjenigen anderer Studien vergleichbar, zumindest in der zweiten Versuchshälfte. *Pomp et al.* (1989) führten reziproke Embryotransfers mit den Inzuchtstämmen C3HeB/FeJ und SWR/J sowie ihrer F1-Kreuzung durch, wobei sich bei 69,4% der durchgeführten Transfers die Embryonen bis zur Geburt entwickelten. Die Überlebensrate der gesamten transferierten Blastozysten betrug 22,7%. Im Hinblick auf diejenigen Rezipienten, von welchen lebender Nachwuchs erhalten wurde, überlebten 30,5% der transferierten Embryonen bis zur Geburt. *Moore et al.* (1970) erhielten eine Schwangerschaftsrate von 68% und eine Überlebensrate der Blastozysten von 31%.

Ein erfolgreicher Embryotransfer ist abhängig von der Qualität der transferierten Embryonen, den Rezipienten und den Transfertechniken, wobei diese oft der limitierende Faktor sind. Die hier durchgeführte klassische Methode des Embryotransfers von *Beatty* (1951) und *McLaren und Michie* (1956) involviert die Nadelpunktur durch die Uteruswand nahe der utero-tubalen Verbindung in das Uteruslumen, gefolgt von der Insertion einer Transferpipette und dem Transfer der Embryonen. Die Schwangerschaftsrate nach dem Transfer variiert von 0%-75%, abhängig von den Fähigkeiten des Operateurs (Chin und Wang, 2001). Die Ursachen für den variablen Erfolg liegen vermutlich in der Ausstoßung der Embryonen aus dem Uterus nach dem Transfer (Goto et al., 1993), was durch ein Trauma der Reproduktionsorgane und dadurch bedingten Kontraktionen des Uterus verursacht werden könnte. Dies soll durch den intraendometrialen Embryotransfer verhindert werden, bei welchem die Insertion der Embryonen direkt in das Endometrium erfolgt (Nakayoma et al., 1995; Goto et al., 1992).

Auch existiert aufgrund des positiven Drucks innerhalb des Uterus das Problem, dass transferierte Embryonen während und nach dem traditionellen Transferprozess leicht wieder aus dem punktierten Loch herausfließen. Um dies zu verhindern wurde der utero-tubale Transfer entwickelt (Chin und Wang, 2001), bei dem die Insertion der Transferpipette von der Uterus- auf die Oviduktseite der utero-tubalen Verbindung verlagert wurde. Die Autoren erhielten mit dieser Methode eine Implantationsrate von 100%, die Lebensfähigkeit der Embryonen variierte von 60%-95%.

Es existiert auch eine Technik des transzervikalen Uterustransfers, welche keinen operativen Eingriff erfordert (Mitchell et al., 2002), jedoch wird diese nicht routinemäßig angewandt. Eine höhere Erfolgsrate des Embryotransfers könnte mit natürlich verpaarten Embryo-Donatoren erreicht werden, da in vielen Studien schädliche Effekte der Superovulation festgestellt wurden (Ertzeid und Storeng, 2001, 1992; Ertzeid et al., 1993; Beaumont und Smith, 1975). Nach erfolgter Hormonbehandlung wurde ein höherer Anteil von abnormen Präimplantations-Embryonen, eine niedrigere Implantationsrate, eine erhöhte Mortalität nach der Implantation sowie reduziertes Gewicht und Entwicklungsretardierung der lebenden Feten beobachtet. Die Superovulation erhöht den Anteil von chromosomalen Abnormalitäten in Mausembryonen (Elbing und Colot, 1987, 1985; Luckett und Mukherjee, 1986), weiterhin werden die schädlichen Effekte vermutlich durch ein hormonelles Ungleichgewicht und/oder Modifikationen der uterinen Umwelt verursacht (Ertzeid und Storeng, 2001; Van der Auwera und D' Hooghe, 2001; Szoltys et al., 1994; Elmazar et al., 1989). In einer Studie von *Kovacs et al.* (1993) konnte jedoch keine Verminderung der Lebensfähigkeit der durch Superovulation erhaltenen Blastozysten nach Transfer in eine pseudoschwangere Leihmutter festgestellt werden.

Möglicherweise wurden beim isogenen Transfer des Stammes DBA auch deshalb so schlechte Ergebnisse erzielt, da die Tiere zum Teil mehrmals superovuliert werden mussten. Jedoch wurden in einer Studie von *Combelle und Albertini (2003)* kompensatorische Mechanismen postuliert, welche die Entwicklungskompetenz von mehrfach superovulierten Oozyten verbessern. In einer anderen Studie wurde aber ein erhöhtes Vorkommen von Spindeldefekten bei ovulierten Mauseiern gefunden, welche multiplen Runden der Superovulation unterworfen waren (Van Blerkom und Davis, 2001).

Höhere Erfolgsraten des Embryotransfers könnten auch durch Verbesserung des Kultur- oder Transfermediums erreicht werden. Dies könnte durch Zugabe von Hyaluronsäure (Gardner et al., 1999), Epidermal Growth Factor (EGF) (Morita et al., 1994), Platelet Activating Factor (PAF) (Roudebush et al., 2004) oder Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Mitchell et al., 2002) erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Implantationseffizienz besteht in der artifiziellen Öffnung der Zona pellucida vor dem Transfer (Liu et al., 1993). Dies kann mechanisch mittels partieller Zona-Dissektion oder durch „Zona-Drilling“ mit saurer Tyrode's Lösung erfolgen (Liu et al., 1993), eine weitere Möglichkeit besteht in der Zugabe von Proteasen zum Kulturmedium (Lee et al., 1997). Die Zona pellucida sollte jedoch nicht vollständig vom Embryo entfernt werden.

In der vorliegenden Studie wurden bei zwei durch Embryotransfer erzeugten Mäusen Abnormalitäten festgestellt. Eine Maus hatte eine Missbildung an der Vorderpfote, eine weitere Maus hatte multiple Abnormalitäten mit einer verdickten Herzwand und einer geschrumpften Leber. Abnormalitäten aufgrund der Prozedur des Embryotransfers wurden bisher vor allem bei Wiederkäuern gefunden, wobei dort ungewöhnlich großer Nachwuchs geboren wurde, welcher auch andere Veränderungen in Organ- und Gewebeentwicklung und plazentale Anomalien zeigte („Large Offspring“-Syndrom) (Sinclair et al., 2000; Walker et al., 1996). Dies ist jedoch vermutlich durch die in-vitro-Kultur der Embryonen in komplexen Seren oder die Co-Kultur von somatischen Zellen bedingt, welche zu einer abweichenden Expression von Genen mit genomischen Imprinting führt (McEvoy et al., 2001; Sinclair et al., 2000; Niemann und Wrenzycki, 2000). Im Gegensatz dazu konnten in den Studien von *Van der Meer et al.* (1999, 2001) keine negativen Einflüsse von biotechnologischen Prozeduren zur Herstellung von transgenen Tieren, einschließlich Embryotransfer, auf die anatomische/morphologische Entwicklung der Nachkommen gefunden werden.

## **2. Verhaltensuntersuchungen**

Das Angstverhalten der Nachkommen der verschiedenen Transfergruppen sowie der unbehandelten Mäuse eines jeden Stammes wurde in drei Verhaltenstests (Motilitätsbox, EPM und Furcht-sensitivierte ASR) untersucht.

Die Ausgangsstämme unterschieden sich signifikant in ihrem Verhalten in der Motilitätsbox, wobei NMRI-Mäuse die höchste horizontale und vertikale Aktivität aufwiesen, Mäuse des Stammes DBA zeigten intermediäre Aktivität, wohingegen C3H-Mäuse die geringsten Werte lieferten. Die Verweildauer im Zentrum der Box als ein Indikator des Angstverhaltens unterschied sich nur in den ersten 5 Minuten des Tests signifikant zwischen den Stämmen C3H und DBA, wobei C3H-Mäuse weniger ängstlich waren. Auf dem EPM zeigten Mäuse des Auszuchtstammes NMRI ebenfalls wieder die höchste Aktivität und waren weniger ängstlich im Vergleich zu den beiden Inzuchtstämmen, welche sich in diesem Verhaltenstest nicht signifikant unterschieden. In der Furcht-sensitivierten ASR wiesen DBA-Mäuse eine

geringere Amplitude der Schreckreaktion als die anderen beiden Stämme auf. Auch existierte, wie erwartet, ein Unterschied zwischen den Stämmen C3H und DBA in der Sensitivierung dieses Reflexes durch die Fußschocks, wobei DBA-Mäuse weniger „ängstlich“ als C3H-Mäuse waren. Dieses Verhalten der drei Mäusestämme stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein (Yilmazer-Hanke et al., 2003; Logue et al., 1997).

Die Tatsache, dass NMRI-Mäuse auf dem EPM das geringste Angstverhalten zeigten, wohingegen bei der Furcht-sensitivierten ASR die Mäuse des Stammes DBA die geringste Sensitivierung des Reflexes aufwiesen, ist nicht verwunderlich, da verschiedene Verhaltenstests unterschiedliche Formen der Angst messen (Clément et al., 2002; Flaherty et al., 1998) und die Verhaltensparameter dieser drei Tests für Angstverhalten in einer Faktoranalyse zu verschiedenen Faktoren beitragen (Yilmazer-Hanke et al., 2003, 2004b; Aguilar et al., 2002; Griebel et al., 1996b). Des Weiteren wurde in einer Studie von *Homanics et al.* (1999) keine Korrelation zwischen dem Angstverhalten im OF und auf dem EPM gefunden. Auch wurde in den Studien von *Yilmazer-Hanke et al.* (2002, 2004a) mit Wistar-Ratten und Ratten der Roman-Linien entgegengesetztes Verhalten der Tiere in explorativen Verhaltenstests (Motilitätsbox, EPM) und der Furcht-sensitivierten ASR gefunden, welche ein nicht vermeidbares Reflexverhalten untersucht.

## 2.1 Effekt der Transferprozedur

Um die Frage zu klären, ob die Prozedur des Embryotransfers per se einen phänotypischen Effekt auf den Nachwuchs produziert, wurde das Verhalten der unbehandelten Kontrolltiere eines jeden Stammes mit demjenigen der entsprechenden isogenen Transfergruppe verglichen. Beim Inzuchtstamm DBA konnten keine Effekte der Transferprozedur auf die untersuchten Parameter der drei Verhaltenstests festgestellt werden. Beim Inzuchtstamm C3H wirkte sich die Prozedur des Embryotransfers nur auf die Anzahl der Aufrichtungen in der Motilitätsbox aus, wobei Nachkommen des isogenen Transfers sich häufiger aufrichteten als unbehandelte Mäuse. Im Gegensatz dazu zeigten sich beim Auszuchtstamm NMRI eine Vielzahl von Effekten des Embryotransfers auf Verhaltensparameter der Motilitätsbox und der Furcht-sensitivierten ASR, unter anderem auch ein erhöhtes Angstverhalten der Nachkommen des isogenen Transfers in beiden Verhaltenstests sowie ein Trend zu einem höheren Aufrichtverhalten in der Motilitätsbox.

Eine unterschiedliche Sensitivität von Mäusestämmen gegenüber der Prozedur des Embryotransfers wurde auch in anderen Studien bei anatomischen/morphologischen Merkmalen beschrieben (Atchley et al., 1991; Cowley et al., 1989). Es ist unklar, wie solch unter-

schiedliche Effekte der Transferprozedur auf das Verhalten der Mäusestämme zustande kommen. Da die Prozedur des Embryotransfers jedoch ein operativer Eingriff ist, verursacht er bei den Rezipienten vermutlich ein gewisses Maß an Stress. In vielen Studien wurde ein erhöhtes Angstverhalten der Nachkommen nach pränatalem Stress in auf freier Exploration beruhenden Verhaltenstests, wie OF und EPM, festgestellt (Vallée et al., 1997; Weinstock, 1997; Poltyrev et al., 1996). Weiterhin waren pränatal gestresste Tiere in der ersten Woche nach der Geburt signifikant leichter als nicht-gestresste Tiere (Chapillon et al., 2002; Meek et al., 2000), was den Befunden nach dem Embryotransfer entspricht. Diese Effekte werden vermutlich durch das postnatale maternale Verhalten vermittelt, da Stress während der Schwangerschaft das maternale Verhalten in der Säugeperiode beeinflusst (Champagne und Meaney, 2000; Maccari et al., 1995; Moore und Power, 1986) und gestresste Mäusemütter weniger Nahrung zu sich nehmen (Ward und Wainwright, 1988). So könnte eine unterschiedliche Stressanfälligkeit der Leihmütter (oder der transferierten Blastozysten) der verschiedenen Stämme zu Unterschieden im Angstverhalten des adulten Nachwuchses führen. In einer Studie von *Kinsley und Svare* (1987) wurden solche stammesabhängigen Effekte von pränatalem Stress auf das adulte Aggressionsverhalten von Mäusen beschrieben.

Jedoch führte pränataler Stress bei Mäusen, im Gegensatz zu den Befunden des Embryotransfers in dieser Studie, nur zu einer erhöhten horizontalen und vertikalen Aktivität im juvenilen, nicht aber im adulten Alter (Fonseca et al., 2002; Alonso et al., 2000).

Auch ist der Präimplantationsembryo sensitiv gegenüber epigenetischen Modifikationen, da während der frühen Embryonalentwicklung extensive Veränderungen in der Genom-weiten Methylierung stattfinden (Yoder et al., 1997). Neuere Studien haben gezeigt, dass eine suboptimale in-vitro-Kultur von Mausembryonen zu abweichenden epigenetischen Modifikationen im Genom sowie zu signifikanten Veränderungen im Angstverhalten und der lokomotorischen Aktivität des adulten Nachwuchses führen kann (de Kloet et al., 2005; Ecker et al., 2004; Fernández-Gonzalez et al., 2004). Auch könnten die Embryonen verschiedener Mäusestämme unterschiedlich empfindlich gegenüber solch biotechnologischen Prozeduren sein, was zu stammesabhängigen Verhaltensänderungen führen könnte (Dulioust et al., 1995). Ein Effekt der Transferprozedur auf das Aufrichtverhalten der Nachkommen wurde auch in einer Studie von *Denenberg et al.* (1998) gefunden, wo der isogene Transfer von BXS<sup>B</sup>-Yaa<sup>+</sup>-Mäusen zu einer höheren vertikalen Aktivität des Nachwuchses im OF führte. Jedoch unterschied sich in dieser Studie die isogene Transfergruppe nicht nur durch die Prozedur des Embryotransfers von den unbehandelten Kontrolltieren, sie wurden auch per Kaiserschnitt zur Welt gebracht und hatten eine andere postnatale Umwelt, sodass unklar ist, ob der beobachtete Effekt dem Embryotransfer zuzuschreiben ist. Nichtsdestoweniger stimmt

der Anstieg in der vertikalen Aktivität mit dem in dieser Studie beobachteten Transfereffekt beim Inzuchtstamm C3H überein.

In der vorliegenden Studie existierte ein großer Unterschied zwischen den beiden Inzuchtstämmen und dem Auszuchtstamm NMRI in Bezug auf die Effekte des Embryotransfers. Dies könnte durch die genetische Inhomogenität des Nachwuchses des Auszuchtstammes erklärt werden, da Mütter ihren genetischen Nachwuchs am Uringeruch, basierend auf dem MHC-Komplex (H-2 Komplex bei Mäusen) der Jungtiere, erkennen können (Yamazaki et al., 2000; Manning et al., 1992). So sollten die Nachkommen der isogenen Transfers von DBA- und C3H-Blastozysten von ihren Leihmüttern als ihr eigener genetischer Nachwuchs erkannt werden. Im Gegensatz dazu zeigen die isogenen Nachkommen des Auszuchtstammes NMRI vermutlich größere Abweichungen von den MHC-Genotypen ihrer Leihmütter als die unbehandelten Kontrolltiere dieses Stammes. Jedoch konnten *Manning et al.* (1995) keine auf dem MHC-Komplex basierende Unterscheidung der Jungtiere von ihren Müttern in Erkennungs-Assays mit semi-wilden *Mus musculus* mit bekanntem MHC-Typ finden.

Transfereffekte könnten auch aufgrund kleinerer Wurfgrößen nach dem Embryotransfer entstehen. Zwar wurde in dieser Studie die Wurfgröße beschränkt, um mögliche Ernährungseffekte auszugleichen, dennoch wiesen die isogenen Transfergruppen etwas geringere Wurfgrößen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren auf. Dies machte sich jedoch vorwiegend bei den Inzuchtstämmen DBA und C3H und weniger beim Auszuchtstamm NMRI bemerkbar. Einige Studien weisen darauf hin, dass das emotionale Verhalten der Tiere mit der Größe des Wurfes variiert (Priestnall, 1973; La Barba und White, 1971). Jedoch führten in diesen Studien größere Würfe zu einer höheren Emotionalität der Tiere, was dem Verhalten der Nachkommen des isogenen Transfers des NMRI-Stammes widerspricht, welche trotz etwas geringerer Wurfgröße ein erhöhtes Angstverhalten zeigten.

Im Gegensatz dazu konnten in den Studien von *Van der Meer et al.* (1999, 2001) keine signifikanten Einflüsse von biotechnologischen Prozeduren, welche in die Produktion von transgenen Tieren involviert sind (Mikroinjektion, in-vitro-Kultur und Embryotransfer), auf verschiedene Verhaltensaspekte der Nachkommen, wie lokomotorische Aktivität, Angst und Exploration in einer unbekanntem Umgebung, gefunden werden.

## 2.2. Genetische und maternale Einflüsse auf das Verhalten

Mit Hilfe der reziproken Embryotransfers zwischen den drei Mäusestämmen wurden genetische und maternale Einflüsse auf das Verhalten des adulten Nachwuchses in den drei Verhaltenstests untersucht. Dabei wurde zuerst eine drei-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, um den Einfluss des genetischen Hintergrundes, maternalen Faktoren und des Geschlechtes sowie auch Interaktionen zwischen diesen Faktoren zu bestimmen. Die in der drei-faktoriellen ANOVA ermittelten signifikanten Effekte des genetischen Hintergrundes der Nachkommen und maternalen Faktoren wurden anschließend zur genaueren explorativen Charakterisierung weiter mit Hilfe von ein-faktoriellen ANOVAs und einer nachfolgenden paarweisen Analyse mittels Tukey-Tests untersucht.

### 2.2.1. Genetische Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen

Das Verhalten des Nachwuchses wurde in allen drei Tests stark von der genetischen Herkunft der Embryonen beeinflusst. Dies ist nicht verwunderlich, da das fetale Genom schon im 2-Zell-Stadium aktiviert wird (Review: Latham, 1999) und somit zur Entwicklung im Uterus beiträgt. In der Motilitätsbox wurden signifikante Einflüsse des Blastozysten-Stammes auf die horizontale und vertikale Aktivität bei Rezipienten aller drei Stämme festgestellt. Der genetische Einfluss auf die Verweildauer im Zentrum der Box, also auf das Angstverhalten, erreichte die Signifikanzschwelle nur knapp und wurde nur nach Transfer der Blastozysten in C3H-Rezipienten gefunden. Auf dem EPM wurden Einflüsse des genetischen Hintergrundes der transferierten Embryonen auf die Aktivität der Nachkommen bei allen drei untersuchten Rezipientenstämmen gefunden, aber nur beim Transfer in NMRI-Rezipienten konnte ein genetischer Einfluss auf das Angstverhalten festgestellt werden. Bei der Furcht-sensitivierten ASR war die Amplitude des Reflexes beim Transfer in Rezipienten aller Stämme vom Genotyp der Nachkommen abhängig, während die genetischen Einflüsse auf die Sensitivierung dieses Reflexes sich zwischen den Rezipienten-Stämmen unterschieden. Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die horizontale und vertikale Aktivität und die Amplitude der ASR signifikant von der genetischen Herkunft der Tiere bestimmt wurden, während genetische Einflüsse auf das Angstverhalten variabel und stammesabhängig waren.

Die hier beobachteten variablen genetischen Einflüsse auf das Angstverhalten der Tiere im EPM stehen im Gegensatz zu anderen Studien bei Mäusen (Lamberty und Gower, 1996; Trullas und Skolnick, 1993) und Ratten (Berton et al., 1997; Rex et al., 1996). In der Studie von *Trullas und Skolnick* (1993) wurden 78% bzw. 69% der Varianz unter den 16 untersuchten Mausinzuchtstämmen in der verbrachten Zeit und der Anzahl der Eintritte in die

offenen Arme des EPM genetischen Faktoren zugeschrieben. Im Gegensatz dazu waren nur 27% und 42% der Varianz zwischen den Stämmen in der ambulatorischen Aktivität im OF und auf dem EPM genetisch bedingt.

Auch wurde bei Nagern durch quantitative genetische Untersuchungen, wie Selektionsstudien und den Vergleich von Inzuchtstämmen, ein signifikanter genetischer Beitrag zum Angstverhalten festgestellt (Wigger et al., 2001; Simmel and Bagwell, 1983; DeFries et al., 1978). Durch Kreuzungen zwischen Nagerinzuchtstämmen ist es möglich, genetische Loci zu kartieren, welche das Verhalten in Nagermodellen von Angst beeinflussen (Quantitative Trait Loci (QTL)-Analysen) und eine Vielzahl von Genloci für das Angstverhalten wurde bereits gefunden (Flint, 2003).

Es zeigte sich auch, dass die Effekte der Transferprozedur nicht stabil waren, da sich in einigen Fällen die Nachkommen der transferierten Blastozysten wie die unbehandelten Kontrolltiere verhielten, wohingegen bei anderen Parametern ihr Verhalten demjenigen der isogenen Transfergruppen entsprach.

Ein Einfluss des Geschlechts auf das Verhalten des Nachwuchses wurde nur bei der Amplitude der ASR gefunden, wo Männchen generell schreckhafter waren als Weibchen. Dieser Befund ist übereinstimmend mit der Studie von *Logue et al.* (1997), in welcher bei 5 von 13 Inzuchtstämmen eine höhere Schreckhaftigkeit der Männchen festgestellt wurde, steht jedoch im Gegensatz zur Studie von *Yilmazer-Hanke et al.* (2003), wo keine Geschlechtsunterschiede in der Amplitude der ASR bei 7 Mäusestämmen gefunden wurden. In anderen Studien wurden Geschlechtsunterschiede auf dem EPM beschrieben, wobei Weibchen für gewöhnlich eine höhere Aktivität und eine geringere Vermeidung von offenen Armen aufwiesen als Männchen (Wigger et al., 2001; Rodgers und Cole, 1993; Johnston und File, 1991). Geschlechtsabhängige Verhaltensunterschiede könnten entstehen, da sich einigen Studien zufolge die Mütter mancher Mäusestämme mehr um den männlichen als um den weiblichen Nachwuchs kümmern (Moore, 1995; Birke und Sadler, 1991; Alleva et al., 1989).

### 2.2.2 Maternale Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen

Maternale Effekte auf das Verhalten des Nachwuchses wurden ebenfalls in allen drei Verhaltenstests gefunden, jedoch zeigten sich hier wiederum Unterschiede zwischen den beiden Inzuchtstämmen C3H und DBA und dem Auszuchtstamm NMRI.

Bei den beiden Inzuchtstämmen wurden maternale Effekte auf das Aufrichtverhalten der Nachkommen in der Motilitätsbox und auf die Amplitude der ASR festgestellt. Der Transfer von Blastozysten in DBA-Leihmütter führte zu einem reduzierten Aufrichtverhalten des Nachwuchses in der Motilitätsbox, bei der Furcht-sensitivierten ASR wurde eine reduzierte Schreckhaftigkeit des Nachwuchses der beiden Inzuchtstämme nach Transfer in NMRI-Leihmütter beobachtet. Ein maternaler Einfluss auf die Sensitivierung dieses Reflexes wurde nur beim Nachwuchs von DBA-Blastozysten festgestellt, wo der Transfer in NMRI-Rezipienten zu einer reduzierten „gesamten“ Sensitivierung, verglichen mit dem isogenen Transfer, führte.

Im Gegensatz zu den beiden Inzuchtstämmen wurden beim Auszuchtstamm NMRI maternale Einflüsse auf eine Vielzahl von Verhaltensparametern in allen drei Tests mit Hilfe der ein-faktoriellen ANOVAs ermittelt. In der Motilitätsbox wurden alle untersuchten Verhaltensparameter durch die genetische Herkunft der Leihmütter beeinflusst. Der Transfer von NMRI-Blastozysten in DBA-Leihmütter führte bei den Nachkommen zu einer erhöhten lokomotorischen Aktivität und, wie auch bei den beiden Inzuchtstämmen, einem reduzierten Aufrichtverhalten. Die Verweildauer des Nachwuchses im Zentrum der Box als ein Indikator des Angstverhaltens wurde durch den Transfer in C3H- und DBA-Rezipienten erhöht. Auf dem EPM wurde nur die auf der zentralen Plattform des Maze verbrachten Zeit von maternalen Faktoren beeinflusst. Wie auch bei den beiden Inzuchtstämmen führte der Transfer in NMRI-Leihmütter zu einer reduzierten Schreckhaftigkeit des Nachwuchses in der Furcht-sensitivierten ASR.

Die Anwesenheit von maternalen Einflüssen auf das Angstverhalten der Nachkommen in der Motilitätsbox steht im Gegensatz zur Studie von *De Fries et al.* (1967), in welcher durch Ovartransplantation gezeigt wurde, dass die maternale Umwelt nur zu einem kleinen Teil der Varianz im Verhalten im Open Field beiträgt.

Das Aufrichtverhalten der Tiere scheint besonders durch Umweltfaktoren beeinflusst zu werden, da es sowohl durch den Embryotransfer (bei C3H-Mäusen signifikant, bei NMRI-Tieren nur Trend) wie auch durch maternale Faktoren bei Mäusen aller drei Stämme verändert wurde. Auch hatten maternale Faktoren den größten Einfluss auf Blastozysten des Auszucht-stammes NMRI und diese entwicklungsmäßige Labilität von NMRI-Embryonen

wurde auch bei den Effekten der Transferprozedur gefunden.

Interaktionen zwischen genetischen und maternalen Faktoren auf das Verhalten des Nachwuchses wurden nur bei der Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme und die zentrale Plattform des EPM gefunden, sowie bei der in der zentralen Plattform verbrachten Zeit. Dies ist verwunderlich, da man mehr stammesabhängige maternale Effekte erwarten würde. Jedoch ist die Varianzanalyse relativ insensitive für die Untersuchung von Genotyp-Umwelt-Interaktionen, da die Anzahl der Tiere, welche für die Untersuchung einer Interaktion mit adäquater statistischer Aussage benötigt wird, viel größer ist als bei den Einzeleffekten (LeRoy et al., 2001; Wahlsten, 1990).

Die durchgeführte zusammenfassende Analyse der Hauptmerkmale des Verhaltens mit Hilfe der stabilen multivariaten Verfahren nach Läuter (Läuter, 1996; Läuter et al., 1995) zeigte signifikante genetische Einflüsse auf alle untersuchten Verhaltensmerkmale (Aktivität, Aufrichtung, Angst und Schreckhaftigkeit). Maternale Effekte wurden jedoch nur beim Aufrichtverhalten und der Schreckhaftigkeit des Nachwuchses gefunden. Eine Wechselwirkung zwischen genetischen und maternalen Effekten existierte bei der Aktivität der Nachkommen. Das Angstverhalten wurde in dieser Analyse durch Parameter aller drei Verhaltens-tests repräsentiert, obwohl bekannt ist, dass diese zu unterschiedlichen Faktoren in Faktoranalysen beitragen. Trotzdem ist es legitim, diese mittels multivariaten Verfahren zu einem Faktor zusammenzufassen.

### **2.3 Uterine und postnatale Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen**

Mit der Methode des reziproken Embryotransfers wurde der globale maternale Effekt auf das Verhalten der Nachkommen untersucht, da diese denselben Genotyp und dieselbe mitochondriale DNA (mtDNA) besaßen, sich jedoch in der globalen maternalen Umwelt unterschieden. Um diese maternalen Einflüsse in uterine und postnatale Faktoren zu unterteilen, wurde ein zusätzlicher Jungenaustausch beim Stamm NMRI durchgeführt.

#### *2.3.1 Uterine Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen*

Uterine Einflüsse auf Verhaltensparameter des Nachwuchses wurden auf das Aufrichtverhalten und die Verweildauer im Zentrum der Motilitätsbox, die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme des EPM und die Amplitude der ASR gefunden. Alle ermittelten uterinen Effekte veränderten das Verhalten der Nachkommen entsprechend dem Verhalten der Leihmütter.

Uterine Einflüsse auf den sich entwickelnden Embryo können unter anderem vermittelt

werden durch die plazentale Permeabilität, maternale mRNA-Transkripte, Hormonsekretion, maternales Alter, Kondition der Mutter, vorherige Schwangerschaften, Dauer der Schwangerschaft und Wurfgröße (Carlier et al., 1999; Rossiter, 1996; Crusio und Schmitt, 1996).

Es wurden bereits uterine Einflüsse auf das adulte kognitive Verhalten des Nachwuchses von *Denenberg et al.* (1998, 2001) beschrieben. Durch verschiedene Embryotransfer-Experimente mit autoimmunen Mäuseinzuchtstämmen und dem Hybridstamm CB6F1 zeigten die Autoren, dass in einen Hybriduterus transferierte Mäuse bessere kognitive Werte im Diskriminierungs-Lernen, im Shuttlebox-Lernen, im Lashley-Maze und im Morris Water-Maze erzielten.

Uterine Effekte, welche das Verhalten der Jungtiere in Richtung des Verhaltens der Leihmütter beeinflussten, wurden auch in einer Studie von *Erkadius et al.* (1996) gefunden. Dort spielte ein maternaler uteriner Faktor eine Rolle in der Entwicklung des Salzappetites bei spontan hypertensiven Ratten (SHR).

Weitere uterine Effekte wurden auf das Überleben der transferierten Embryonen (Ernst et al., 2000; Pomp et al., 1989), die sensorische und motorische Entwicklung (Crusio und Schmitt, 1996; Roubertoux et al., 1990; Nosten und Roubertoux, 1988), den freiwilligen Ethanolkonsum (Randall und Lester, 1975) und das Gewicht und die Schwanzlänge (Ernst et al., 2000; Cowley et al., 1989; Brumby, 1960) der Nachkommen beschrieben.

### 2.3.2 Postnatale Einflüsse auf das Verhalten von NMRI-Mäusen

Postnatale Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen wurden in der Motilitätsbox beim zurückgelegten Weg und beim Aufrichtverhalten gefunden, wie auch bei der Amplitude der ASR. Jedoch wurde hier bei den Nachkommen das Aufrichtverhalten und die Amplitude der ASR entgegengesetzt dem Verhalten des Aufzuchtstammes verändert.

Die meisten der bisher durchgeführten Studien bezüglich maternaler Effekte auf das Verhalten des Nachwuchses haben nur postnatale maternale Effekte durch Adoption untersucht. Postnatale Effekte im OF in entgegengesetzter Richtung zum Verhalten des Adoptionsstammes wurden auch in anderen Studien mit Mäusen und Ratten beschrieben (Gomez-Serrano et al., 2001; van Abeelen, 1980). Wurden DBA-Jungtiere von C57BL/6-Leihmüttern aufgezogen, so zeigten die adulten Nachkommen eine geringere horizontale und vertikale Aktivität, was entgegengesetzt zum Verhalten des Adoptionsstammes war (van Abeelen, 1980). Andere Adoptionsstudien mit Rattenstämmen fanden jedoch keine postnatalen maternalen Effekte auf das Verhalten im OF (Ohta et al., 1998; Cierpial et al., 1989) und auf dem EPM (Wigger et al., 2001). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie fanden *Gomez-Serrano et al.* (2001) postnatale Effekte in der ASR in Richtung des Stammes der Leihmutter.

Die Prozedur der Adoption per se könnten auch einen Einfluss auf das Verhalten der Nachkommen gehabt haben. In einer Kreuz-Adoptions-Studie von *Maxon und Trattner* (1981) mit den Inzuchtstämmen DBA/1 Bg und C57 wurde ein Adoptionseffekt auf die Aktivität im OF gefunden. *Bartolomucci et al.* (2004) zeigten, dass eine Leihmutterschaft bei Mäusen zu einem geringeren Angstverhalten bei männlichen Nachkommen führen kann, auch erhöhte die Adoption von ganzen Würfen das maternale Fürsorgeverhalten und verminderte die Stress-induzierte Kortikosteron-Sekretion beim adulten Nachwuchs (*Maccari et al.*, 1995). Jedoch wurden in einer weiteren Kreuz-Adoptions-Studie mit den Inzuchtstämmen DBA/2 und C57BL/6 (*van Abeelen*, 1980) keine Effekte der Adoption auf 9 Verhaltenskomponenten im OF gefunden. So ist ein Effekt der Adoptionsprozedur auf das Verhalten des Nachwuchses vermutlich abhängig vom verwendeten Stamm und dem eingesetzten Verhaltenstest.

Eine weitere Annahme der Adoptionsmethode ist, dass die postnatale Umwelt, welche von der Leihmutter geliefert wird, unabhängig vom Genotyp der adoptierten Jungtiere ist (*Carlier et al.*, 1992). Jedoch unterscheidet sich das Fürsorgeverhalten der Weibchen oft abhängig vom adoptierten Jungenstamm (*Fleming et al.*, 1999; *Ward*, 1980; *Ressler*, 1962). Dies stellt eine klassische Genotyp-Umwelt-Interaktion dar (*Ward*, 1980), welche vermutlich durch Variationen in der Responsivität der Weibchen auf die vom Nachwuchs emittierten Signale (zum Beispiel Vokalisationen im Ultraschall-Bereich) entsteht. Im Gegensatz dazu konnten andere Studien keinen Effekt des Stammes der Jungtiere auf das maternale Verhalten finden (*Carlier et al.*, 1983; *Poley und Rayce*, 1970).

Mögliche Mechanismen für postnatale Effekte sind Unterschiede im maternalen Fürsorgeverhalten und in der Ernährung der Jungtiere. Verschiedene Mäuseinzuchtstämme unterscheiden sich im Brutpflegeverhalten der Weibchen (*Brown et al.*, 1999; *Carlier et al.*, 1982; *Ward*, 1980) und die maternale Fürsorge scheint einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung und die emotionale Reaktivität der Jungtiere zu haben (*Champagne et al.*, 2003; *Calatayud und Belzung*, 2001; *Fleming et al.*, 1999).

Bei der Ratte beeinflussen Variationen in der maternalen Fürsorge die Entwicklung von Verhaltensantworten und endokrinen Antworten auf Stress beim Nachwuchs. Adulte Nachkommen von Müttern, welche eine hohe Frequenz von Fürsorgeverhalten (Lecken und Pflegen) zeigen, weisen ein geringeres Angstverhalten im OF und eine geringere Stressreaktivität in einer neuen Umwelt auf (*Francis et al.*, 1999; *Caldji et al.*, 1998; *Liu et al.*, 1997). Der Einfluss des maternalen Verhaltens wird hierbei vorwiegend über die Expression des hippocampalen Glucokortikoidrezeptors vermittelt, welcher die HPA-Achse kontrolliert (*Liu et al.*, 1997; *Meaney et al.*, 1996). Dies erfolgt durch eine stabile Veränderung der DNA-Methylierung und der Chromatinstruktur im Promotor des Gens für den Glucokortikoid-

Rezeptor (Weaver et al., 2002, 2004; Review: Robinson, 2004). Ein geringes Fürsorgeverhalten der Mutter führt zur Methylierung der Promotorregion kurz nach der Geburt, was zu einer Suppression der Genaktivität und damit zu ängstlichen Nachkommen führt (Weaver et al., 2004).

Das maternale Verhalten hat auch einen Einfluss auf die Expression weiterer Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>-, Benzodiazepin-, NMDA-Rezeptoren), Neuropeptide (CRF), Nervenwachstumsfaktoren (BDNF), sowie auf die hippokampale Synaptogenese, welche in emotionale Reaktivität und Gedächtnisleistungen involviert sind (Branchi et al., 2004; Bredy et al., 2004; Fries et al., 2004; Caldji et al., 2000, 2003; Diorio et al., 2000; Liu et al., 2000).

Des Weiteren zeigten *Francis et al.* (1999), dass Variationen in der maternalen Fürsorge die Basis einer nicht-genomischen Vererbung von individuellen Unterschieden in der Stressreaktivität über Generationen sein können (Review: Meaney, 2001; Champagne und Meaney, 2001; Fleming et al., 1999), welche die Expression des Oxytocin-Rezeptorgens zu involvieren scheint (Meaney, 2001; Champagne et al., 2001; Francis et al., 2000).

Weiterhin führt auch eine lange Separation von der Mutter beim adulten Nachwuchs von Nagern zu einem Anstieg der Emotionalität und neuroendokrinen Reaktivität (Romeo et al., 2003; Schmidt et al., 2002; Huot et al., 2001; Ladd et al., 2000; Wigger und Neumann, 1999; Barbazange et al., 1996), kurzes postnatales „Handling“ der Jungtiere dagegen führt zu einem verminderten Angstverhalten der adulten Tiere im OF und EPM (Sternberg und Ridgway, 2003; Meerlo et al., 1999; Anisman et al., 1998). Die Effekte des postnatalen „Handlings“ könnten durch eine vermehrte maternale Fürsorge nach dem „Handling“ vermittelt werden (Denenberg, 1999; D'Amato et al., 1998; Anisman et al., 1998). Auch führen bessere Aufzuchtbedingungen, wie Exposition in neue Umgebungen, zu einem verminderten Angstverhalten und einem verbesserten Hippokampus-abhängigen Lernen im adulten Leben (Tang, 2001; Chapillon et al., 1999; Zaharia et al., 1996).

Postnatale maternale Einflüsse auf das Angstverhalten des adulten Nachwuchses wurden auch bei Mäusen gezeigt. BALB/c-Mäuse, welche von C57BL/6-Leihmüttern aufgezogen wurden, zeigten ein signifikant geringeres Angstverhalten und moderatere HPA-Antworten auf Stress sowie eine vermehrte Expression der  $\gamma$ 2-Untereinheit des BZ/GABA<sub>A</sub>-Rezeptors im zentralen Nucleus der Amygdala (Caldji et al., 2004; Zaharia et al., 1996). Jedoch wurde bei C57BL/6-Mäusen das relativ geringe Angstverhalten nicht erhöht durch eine Aufzucht von BALB/c-Leihmüttern.

In der vorliegenden Studie unterschieden sich besonders die Mäusestämme DBA und NMRI im Brutpflegeverhalten der Muttertiere. DBA-Mäuse werden generell als „schlechte Mütter“ angesehen, da sie relativ wenig Zeit im Nest verbringen und sich nicht sehr viel um ihre

Jungen kümmern (Ward, 1980), NMRI-Mäuse hingegen sind „gute Mütter“, da sie die meiste Zeit mit der Aufzucht und Pflege ihrer Jungen verbringen. Die schlechtere maternale Umwelt von DBA-Tieren könnte verantwortlich sein für das geringere Aufrichtverhalten des Nachwuchses, während das bessere Fürsorgeverhalten von NMRI-Müttern die beobachtete reduzierte Schreckhaftigkeit der Nachkommen vermitteln könnte.

Auch liefern Mütter verschiedener Mäusestämme Milch, welche sich in ihrer Quantität und ihren biochemischen Eigenschaften unterscheidet (Meier et al., 1965). Solche Unterschiede in der Quantität und der nutritiven Qualität der Milch könnten zu Unterschieden in der Entwicklung des ZNS führen, welche sich anschließend im Verhalten der Nager manifestieren könnten (Akman et al., 2004; Wainwright, 1992, 2001; Carrié et al., 2000; Umewaza et al., 1999). Zwar wurde die Wurfgröße auf 8 Tiere beschränkt, um möglichen Ernährungseffekten entgegenzuwirken, dennoch war die Größe der Würfe bei den Transfergruppen etwas unterschiedlich.

Als generelle Schlussfolgerung kann festgestellt werden, dass, wenn uterine und postnatale maternale Faktoren denselben Verhaltensparameter beeinflussten, die uterinen Faktoren das Verhalten des Nachwuchses in Richtung des Rezipienten-Stammes veränderten, während die postnatalen Faktoren diesem Effekt entgegenwirkten.

Im Gegensatz zu den hier beobachteten entgegengesetzten Richtungen von uterinen und postnatalen Effekten zeigten *Francis et al.* (2003) durch prä- und postnatalen Transfer von C57BL/6-Mäusen in C57BL/6- oder BALB/c-Mütter, dass dort die postnatale und uterine Umwelt interagieren müssen, um das Verhalten der Nachkommen im OF, auf dem EPM und dem Morris Water-Maze in Richtung des Mutterstammes zu verändern (Review: Crabbe und Philipps, 2003).

Beim Vergleich der Größenordnungen der uterinen und postnatalen Effekte auf die Verhaltensparameter konnte festgestellt werden, dass der uterine Effekt auf die Schreckhaftigkeit der Nachkommen bedeutender war als der postnatale Effekt (durch Vergleich der p-Werte der t-Tests). Dies stand im Gegensatz zum Aufrichtverhalten der Tiere, wo postnatale maternale Effekte einen größeren Einfluss hatten.

Es sollte beachtet werden, dass die Unterteilung der globalen maternalen Effekte in uterine und postnatale Faktoren nur beim Auszuchtstamm NMRI durchgeführt wurde, und nicht notwendigerweise dieselben Ergebnisse bei den anderen beiden Stämmen liefert.

## **2.4 Weitere mögliche Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen**

In dieser Studie kann ein Einfluss der biologischen Mutter vor dem Zeitpunkt des Transfers (Blastozysten-Stadium) nicht ausgeschlossen werden und die Methode erlaubt auch nicht die Untersuchung von umweltbedingten cytoplasmatischen Effekten, da der Nachwuchs, welcher sich im Cytoplasma unterscheidet, sich ebenfalls in der maternalen Umwelt zwischen Fertilisation und Transfer unterscheidet. Aufgrund dessen ist es nicht möglich, einen reinen genetischen Effekt zu identifizieren (Carlier et al., 1992).

Daneben könnte genomisches Imprinting verantwortlich sein für phänotypische Variation. Dieses Phänomen beschreibt eine Form der Vererbung, welche nicht den Mendelschen Regeln entspricht und zu einem Unterschied in der Expression der zwei parentalen Allele eines autosomalen Locus führt. Es wurden einige Gene mit Imprinting gefunden, welche im Gehirn exprimiert werden und einen Einfluss auf das Verhalten haben (Plagge et al., 2005; Isles und Lawrence, 2000; Lefebvre et al., 1998).

Auch die Umgebung des Raumes, in welchem die Tiere getestet werden, und der Experimentator selbst können einen Einfluss auf die Ergebnisse von Verhaltensuntersuchungen haben (Wahlsten et al., 2003; Crabbe et al., 1999).

## **2.5 Zusammenfassung Verhaltensuntersuchungen**

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Prozedur des Embryotransfers an sich weitreichende Effekte auf das Verhalten der Nachkommen des Auszuchtstammes NMRI hatte. Bei den beiden Inzuchtstämmen hingegen wurden kaum Transfereffekte beobachtet.

Das Verhalten des Nachwuchses wurde vorwiegend von genetischen Faktoren determiniert. Maternale Einflüsse wurden auf das Aufrichtverhalten in der Motilitätsbox und auf die Amplitude der ASR in allen drei untersuchten Mäusestämmen gefunden wurden, während beim Auszuchtstamm NMRI weitere maternale Effekte in allen drei Verhaltenstests gefunden wurden. Eine Unterteilung der maternalen Faktoren in uterine und postnatale Effekte wurde nur beim Stamm NMRI durchgeführt, wo uterine Faktoren das Verhalten der Nachkommen in Richtung des Rezipientenstammes veränderten. Bei Verhaltensparametern, bei denen sowohl uterine als auch postnatale Faktoren einen Einfluss auf das adulte Verhalten zeigten, agierten diese Faktoren in entgegengesetzte Richtungen.

### **3. Immunhistochemische Untersuchungen**

Die Verteilung von Neuropeptid Y (NPY)- und Parvalbumin (PARV)- enthaltenden Neuronen in den verschiedenen Amygdalakernen wurde mittels Immunzytochemie untersucht. Diese Untersuchungen wurden nur bei den Inzuchtstämmen DBA und C3H durchgeführt.

#### **3.1 Neuropeptid Y (NPY)**

NPY ist ein Neuropeptid, welches anxiolytische Wirkung in einer Vielzahl von Verhaltenstests zeigt, einschließlich EPM und Furcht-potenzierter ASR (Bannon et al., 2000; Broqua et al., 1995; Heilig, 1995). Im basolateralen Komplex der Amygdala (BLA) finden sich Neuropeptide nur in nicht-pyramidalen Neuronen (McDonald, 1985) und annähernd 80-90% der NPY-immunpositiven Neurone im BLA sind auch GABAerg (McDonald und Pearson, 1989). Es handelt sich hierbei vermutlich um Interneurone (McDonald, 1992; McDonald und Pearson, 1989; Gustafson et al., 1986), jedoch existieren auch einige nicht-pyramidale Projektionsneurone (Amaral et al., 1992; McDonald, 1992). Es wurde gezeigt, dass NPY im Hippokampus der Ratte präsynaptisch die Glutamat-Freisetzung inhibieren und dadurch LTP attenuieren kann (Whittaker et al., 1999; Klapstein und Colmers, 1993). Im BLA verstärkt NPY durch diese Mechanismen vermutlich die Inhibition.

NPY-immunpositive Neurone wurden in allen Amygdalakernen gefunden. Die größte Dichte immungefärbter Neurone wurden im BLA festgestellt, wobei der basolaterale Kern etwas mehr NPY-immunpositive Neurone aufwies als der laterale Kern. Auch im basomedialen Kern der Amygdala waren viele NPY-immungefärbte Neurone zu finden. Im zentralen Kern hingegen fanden sich deutlich weniger immunreaktive Zellen, welche in allen Untereinheiten anzutreffen waren. Jedoch waren sie besonders zahlreich im kapsulären Anteil, da diese Zellen als ein Band vom Striatum herunterzogen und so vor allem im oberen Teil des zentralen Kerns vorkamen. Die meisten immunpositiven Neurone waren klein und bi- oder multipolar und im BLA vorwiegend an den Kerngrenzen lokalisiert.

Die Verteilung der NPY-immunpositiven Neurone bei der Maus steht im Gegensatz zu derjenigen bei der Ratte, wo ebenfalls NPY-positive Neurone in allen bedeutenden Kernen der Amygdala gefunden wurden, sich jedoch im lateralen Kern mehr NPY-immunpositive Neurone befanden als im basolateralen Kern (Yilmazer-Hanke et al., 2002, 2004b; McDonald, 1989). Auch konnten in anderen Studien keine NPY-immunreaktiven Neurone im lateralen Anteil des zentralen Kerns der Ratte gefunden werden, diese kamen nur gelegentlich im medialen und kapsulären Anteil vor (Asan, 1998; McDonald, 1989; Gustafson et al., 1986).

Die Stämme C3H und DBA unterschieden sich nur in der Anzahl NPY-immunpositiver Neurone im kapsulären Anteil des zentralen Kerns (CeAc), wo C3H-Tiere eine höhere Zellzahl aufwiesen. Der CeAc erhält Informationen von den meisten sensorischen Modalitäten und projiziert zum medialen Anteil des zentralen Kerns (CeAm), von welchem die Mehrzahl der absteigenden Projektionen zum Hirnstamm und Hypothalamus ausgeht (Petrovich und Swanson, 1997). Die höhere Anzahl NPY-immunpositiver Neurone im CeAc des Stammes C3H könnte für das etwas geringere Angstverhalten dieser Tiere in der Motilitätsbox verantwortlich sein. Des Weiteren könnte dies auch eine Ursache für die geringere lokomotorische Aktivität dieses Stammes in der Motilitätsbox und auf dem EPM sein, da NPY die lokomotorische Aktivität sowohl in bekannter als auch in einer neuen Umwelt in einer dosisabhängigen Weise reduzieren kann (Heilig und Murison, 1987).

In Studien von *Yilmazer-Hanke et al.* (2002, 2004b) mit Thyroxin-behandelten Wistar-Ratten und Ratten der Roman-Sublinien mit hohem und niedrigem Shuttlebox-Lernen (RHA/Verh und RLA/Verh) wurde eine höhere Anzahl von NPY-immunpositiven Neuronen im basolateralen Komplex bei Linien mit niedrigem Angstverhalten in Explorations-basierenden Verhaltenstests, wie der Motilitätsbox und dem EPM, gefunden. Jedoch konnten in einer weiteren Studie (*Yilmazer-Hanke et al.*, 2004a) mit zwei Wistar-Rattenlinien, welche unterschiedliches Angstverhalten auf dem EPM und in der Furcht-sensitivierten ASR zeigten, keine Unterschiede in der Anzahl NPY-immunreaktiver Neurone in der Amygdala festgestellt werden.

Die Prozedur des Embryotransfers per se hatte keine Auswirkungen auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den Amygdalakernen des Stammes C3H. Im Gegensatz dazu wurden bei Mäusen des Stammes DBA nach dem Transfer weniger NPY-immunpositive Zellen in fast allen Amygdalakernen gefunden. Es ist unklar, wie diese reduzierte Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in fast allen Kerngebieten der Amygdala des Stammes DBA nach dem Embryotransfer zustande kam. Da es jedoch beim isogenen Transfer des Stammes DBA erhebliche Probleme beim postnatalen Überleben der Würfe gab und auch die überlebenden Tiere sehr schlecht von ihren Leihmüttern versorgt wurden, könnte dies in einem erheblichen Stress für den Nachwuchs resultiert haben, ähnlich wie bei einer maternalen Separation. Bei dieser wurde ebenfalls eine verminderte Anzahl NPY-immunpositiver Neurone bei weiblichen Wistar-Ratten gefunden, jedoch nur im basolateralen Kern der Amygdala (*Park et al.*, 2005).

Auch war der Nachwuchs des isogenen Transfers des Stammes DBA aufgrund schlechter postnataler Versorgung sehr klein im Vergleich zu unbehandelten DBA-Tieren. Dies könnte zu einem geringeren Gehirngewicht und somit zu einer Reduktion in der gesamten

Anzahl von Neuronen in der Amygdala geführt haben. Gegen diese These spricht jedoch, dass sich die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen durch den Embryotransfer nicht signifikant verändert hatte. Jedoch wurde in einer Studie von *Yilmazer-Hanke et al.* (2004b) mit Thyroxin-behandelten Wistar-Ratten eine erhöhte Anzahl NPY-immunpositiver Neurone im BLA trotz einer reduzierten Gesamtanzahl der Neurone dieses Kerns gefunden. Daher ist es nicht auszuschließen, dass die hier beobachtete Reduktion der NPY-immunpositiven Zellen nach dem Embryotransfer eine Konsequenz des geringeren Körpergewichts der Tiere nach dem Transfer war.

Die reduzierte Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in fast allen Amygdalakernen machte sich jedoch nicht beim Verhalten des isogenen Transfers des Stammes DBA bemerkbar, da sich das Angstverhalten durch die Transferprozedur nicht signifikant verändert hatte.

Die drei-faktorielle ANOVA zeigte, dass die Anzahl NPY-immunreaktiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen vorwiegend durch die genetische Herkunft der Embryonen bestimmt wurde. Maternale Einflüsse wurden nur auf die Anzahl immunpositiver Zellen im basomedialen Kern gefunden, jedoch existierten signifikante Wechselwirkungen zwischen genetischen und maternalen Faktoren im basolateralen Komplex. Das Geschlecht der Tiere hatte keinen Einfluss auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone. Nachfolgend durchgeführte exploratorische Analysen mittels ein-faktoriellen ANOVAs und anschließenden Tukey-Tests zeigten, dass genetische Einflüsse auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone bei Rezipienten des Stammes C3H nur im zentralen Kern der Amygdala vorhanden waren. Im Gegensatz dazu zeigten sich beim Transfer in DBA-Leihmütter genetische Einflüsse auf die Anzahl immunreaktiver Neurone in fast allen Amygdalakernen.

Maternale Einflüsse auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone wurden nur bei Mäusen des Stammes DBA festgestellt. Dort wurden nach dem Transfer von Blastozysten in C3H-Leihmütter höhere Zellzahlen im zentralen und basomedialen Kern der Amygdala gefunden, die Anzahl der immunpositiven Neurone wurde also entsprechend der Amygdalamorphologie der Leihmutter verändert.

Auch in anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass postnatale Manipulationen einen Einfluss auf die Anzahl NPY-immunreaktiver Neurone im basolateralen Komplex der Amygdala haben können. So führte eine neonatale Thyroxin-Behandlung bei Wistar-Ratten zu einem reduzierten Angstverhalten sowie einem Anstieg in der Anzahl NPY-immunpositiver Neurone im gesamten BLA (*Yilmazer-Hanke et al.*, 2004b). Umgekehrt führte eine maternale Separation von weiblichen Wistar-Ratten zu einem anxiogenen Verhalten im EPM und einer Reduktion der Anzahl NPY-immunpositiver Zellen im basolateralen Kern. Eine nachfolgende Akupunktur konnte das Angstverhalten von maternal separierten Ratten

reduzieren sowie die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone im basolateralen Kern erhöhen (Park et al., 2005). Im Gegensatz dazu fanden *Jiménez-Vasquez et al.* (2001) eine verminderte NPY-Immunreaktivität nach maternaler Separation bei Ratten nur im dorsalen Hippokampus, nicht jedoch in der Amygdala.

### 3.2 Parvalbumin (PARV)

Parvalbumin ist ein Calcium-bindendes Protein, welches neben Calbindin-D<sub>28k</sub> und Calretinin zur Gruppe von Calcium-bindenden Proteinen mit EF-Hand gehört (Schwaller et al., 2002; Baimbridge et al., 1992). Das Protein wird in einer Subpopulation von GABAergen Interneuronen des BLA exprimiert und 94% der PARV-immunpositiven Neurone im BLA sind GABAerg (McDonald und Mascagni, 2001; Kemppainen und Pitkänen, 2000; Morys et al., 1999). Antikörper gegen PARV werden als neuroanatomischer Marker verwendet, um die Verbindungen zwischen spezifischen Zelltypen in immunhistochemischen Studien zu untersuchen (Baimbridge et al., 1992; Celio und Heizmann, 1981), da die vorhandenen Antikörper gegen GABA oder GAD (Glutamat-Decarboxylase) nur das Soma und die proximalen Dendriten von Interneuronen anfärben (Carlsen, 1988). Die Immunhistochemie gegen PARV färbt jedoch nur einen Teil der GABAergen Interneuronen an, bei der Ratte etwa 43% im basolateralen Nucleus und ca. 19% im lateralen Nucleus (McDonald und Mascagni, 2001). Anscheinend exprimieren nur sehr wenige Projektionsneurone des BLA, wenn überhaupt, Calcium-bindende Proteine (Pitkänen und Amaral, 1993, 1994; McDonald, 1994; McDonald und Baimbridge, 1990).

PARV-immunpositive Interneurone erhalten überwiegend exzitatorischen Input von pyramidalen Projektionsneuronen des BLA selbst (ca. 11% der Synapsen), wohingegen nur ca. 1% der Terminalen, welche Synapsen an PARV-immunreaktiven Neuronen bilden, von kortikoamygdaloiden Projektionen stammt (Smith et al., 1998, 2000) und thalamische Axone nur sehr wenige Synapsen an Interneuronen des BLA bilden (< 1%) (LeDoux et al., 1991; Carlsen und Heimer, 1988). Sie sind vorwiegend in die Feedback-Inhibition im BLA involviert, da viele PARV-immunreaktive Neurone Basket- oder Chandelier-Zellen sind, welche inhibitorische Synapsen an den Perikarya oder den initialen Axonsegmenten von pyramidalen Projektionsneuronen bilden (McDonald und Betette, 2001; Smith et al., 1998, 2000; Sorvari et al., 1996). Jedoch zeigen PARV-enthaltende Neurone auch Immunreaktivität für Komponenten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors und erhalten eine GABAerge Innervation (McDonald und Mascagni, 2004; Li et al., 2002), welche vermutlich größtenteils intrinsisch ist und Interneurone involviert (LeGal La Salle et al., 1978). Eine starke GABA-vermittelte

Inhibition von PARV-immunreaktiven Interneuronen könnte über einen disinhibitorischen Mechanismus zu einem Anstieg in der Erregbarkeit von pyramidalen Projektionsneuronen führen, was wichtig sein könnte für synchronisierte rhythmische Oszillationen (McDonald und Mascagni, 2004). In Neuronen des BLA sind GABA und NPY kolokalisiert und NPY könnte direkt die Aktivität von GABAergen Neuronen modulieren durch die Stimulation von Y1-Rezeptoren (Eva et al., 2004; Oberto et al., 2000, 2001; McDonald und Pearson, 1989).

Bei der Immunfärbung gegen PARV waren bei einigen Gehirnschnitten Teile des Schnittes schlecht gefärbt. Bei diesen Gehirnen wurde die Anzahl immunpositiver Zellen nur in den Amygdalakernen der gut gefärbten Gehirnhälfte bestimmt. Da keine Lateralisierung der PARV-immunreaktiven Neurone in der Amygdala festgestellt werden konnte, wurde dieser Wert mit zwei multipliziert.

Die PARV-immunpositiven Neurone waren eine morphologisch heterogene Population von nicht-pyramidalen Interneuronen. Die Mehrzahl der Zellen hatte mittlere Größe und multipolare Somata mit Dendriten von variabler Dicke, welche keine Dornen besaßen. Sie könnten den Typ2-Neuronen entsprechen, welche von *Sorvari et al.* (1995) beschrieben wurden. PARV-immunpositive Neurone fanden sich in der Amygdala vor allem im BLA, wobei diese im basolateralen Kern zahlreicher waren als im lateralen Kern. Auch im basomedialen Kern existierte eine beträchtliche Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone, wohingegen diese im zentralen Kern vergleichsweise wenig gefunden wurden. Dort wies der kapsuläre Anteil dieses Kerns die höchste Anzahl PARV-immunpositiver Zellen auf, im lateralen Anteil waren diese recht selten anzutreffen.

Diese Befunde entsprechen der Verteilung von PARV-immunreaktiven Neuronen in der Amygdala der Ratte (McDonald und Betette, 2001; Celio, 1990), jedoch wurden in einer Studie von *Yilmazer-Hanke et al.* (2002) keine PARV-immunreaktiven Neurone im zentralen Kern der Ratte gefunden.

Zwischen den beiden Inzuchtstämmen C3H und DBA existierten Unterschiede in der Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone im lateralen, basomedialen und zentralen Kern, wobei Mäuse des Stammes DBA höhere Zellzahlen aufwiesen. Da eine vermehrte GABAerge Inhibition der glutamatergen Projektionsneurone im BLA zu einem verminderten Angstverhalten führt, könnte die höhere Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone im BLA des Stammes DBA verantwortlich sein für die geringere Sensitivierung der ASR bei diesem Mäusestamm.

In einer Studie mit Ratten der Roman-Linien (RHA/Verh und RLA/Verh) wurden mehr PARV-immunpositive Neurone im basolateralen Kern der Amygdala bei RLA/Verh-Ratten

gefunden, welche ein geringeres Angstverhalten in Tests, basierend auf explorativem Verhalten, zeigten (Motilitätsbox und EPM) (Yilmazer-Hanke et al., 2002).

Ein Effekt der Transferprozedur auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone wurde nur beim Stamm C3H festgestellt. Dort waren im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren weniger immunpositive Zellen im basolateralen Kern der isogenen Transfergruppe zu finden. Der BLA scheint besonders empfindlich gegenüber Einflüssen im frühen Leben zu sein, da auch eine zeitlich beschränkte neonatale Thyroxin-Behandlung zu einem Anstieg in der Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den Nuclei des BLA bei adulten Ratten führte (Yilmazer-Hanke et al., 2004b).

Die durchgeführte drei-faktorielle ANOVA zeigte wieder einen bedeutenden Einfluss der genetischen Herkunft der Embryonen auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in fast allen Amygdalakernen. Die einzige Ausnahme stellte der basomediale Kern dar, bei welchem jedoch eine signifikante Wechselwirkung zwischen genetischen und maternalen Einflüssen gefunden wurde. In keinem Kern der Amygdala wurde ein signifikanter Einfluss der genetischen Herkunft der Rezipienten festgestellt, auch existierten keine geschlechtsabhängigen Unterschiede.

Die explorativen Analysen mittels ein-faktoriellen ANOVAs zeigten genetische Einflüsse beim Transfer von Embryonen in Rezipienten des Stammes C3H in allen Amygdalakerengebieten. Beim Transfer von Blastozysten in Leihmütter des Stammes DBA wurden genetische Einflüsse jedoch nur auf die Zellzahlen im zentralen Kern der Amygdala gefunden.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass fehlende Unterschiede in der Anzahl immunpositiver Neurone nicht automatisch eine gleiche Synthese oder Freisetzung dieser Proteine innerhalb der Amygdala oder in ihren Projektionsgebieten bedeuten. Des Weiteren ist die Immunzytochemie mehr eine qualitative als eine quantitative Methode und aufgrund schlechter Penetration der Antikörper oder aufgrund anderer unbekannter Gründe könnte es sein, dass nicht alle Antigen-enthaltenden Zellen angefärbt werden und es so zu einer Unterschätzung der exakten Zellzahlen kommt.

### **3.3 Zusammenfassung immunhistochemische Untersuchungen**

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Mäusestämme C3H und DBA vor allem in der Anzahl PARV-immunreaktiver Neurone im basomedialen, lateralen und zentralen Kern der Amygdala unterschieden, wobei DBA-Tiere dort höhere Zellzahlen aufwiesen. Die Prozedur des Embryotransfers führte zu weitreichenden Veränderungen

in der Amydalmorphologie der beiden Mäusestämme, welche jedoch stammesabhängig waren. Die Anzahl NPY- und PARV-immunreaktiver Neurone in den Amygdalakerengebieten der beiden Mäusestämme wurde vorwiegend von genetischen Faktoren determiniert. Maternale Einflüsse wurden nur auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone des Stammes DBA gefunden und diese beeinflussten die Zellzahl entsprechend der Amygdalmorphologie der Leihmutter.

#### **4. Generelle Schlussfolgerung**

Die vorliegende Studie zeigte signifikante Effekte der Transferprozedur an sich, wie auch Einflüsse des Rezipienten-Stammes auf das Verhalten und die Amygdalmorphologie der Nachkommen. Dies könnte Konsequenzen bei der Produktion von transgenen Tieren, bei der Sanierung von Tieren und der Rederivation von kryokonservierten Embryonen mittels Embryotransfer haben. Es existiert eine Vielzahl von Studien, welche die Einflüsse des genetischen Hintergrundes der Tiere für transgene Zwecke untersuchten (Auerbach et al., 2003; Cook und Bolivar, 2002; Wolfer et al., 2002; Gerlai R., 2001; Frankel W.N., 1998; Crawley et al., 1997; Owen et al., 1997; Logue et al., 1997), aber möglichen Effekten des Embryotransfers an sich und des Rezipienten-Stammes wurde bisher wenig Aufmerksamkeit geschenkt (Gingrich und Hen, 2000). Bei einigen transgenen Tieren wurden bereits maternale Einflüsse auf die Verhaltensphänotypen beschrieben (Brody und Geyer, 2004; Weller et al., 2003). So könnten biotechnologische Prozeduren, welche den Transfer von Embryonen in Leihmütter involvieren, potentiell das Verhalten und die Gehirnmorphologie der Nachkommen verändern, zumindest in der ersten Generation. Dies traf in dieser Studie vor allem auf den Auszuchtstamm NMRI zu und könnte möglicherweise ein generelles Phänomen bei Auszucht- und Hybridstämmen aufgrund der höheren Heterozygotie dieser Tiere sein. Doch gerade diese Stämme werden oft und gerne als Rezipienten für den Embryotransfer verwendet, da mit ihnen bessere Ergebnisse mit höheren Wurfgrößen erzielt werden als mit Inzuchtstämmen. Aufgrund der vorliegenden Studie ist jedoch davon auszugehen, dass sich die so erzeugten Nachkommen im Verhalten und in der Amygdalmorphologie grundlegend von den Ausgangsstämmen unterscheiden.

## E. Literaturverzeichnis

- Adolphs R., Tranel D., Hamann S., Young A.W., Calder A.J., Phelps E.A., Anderson A., Lee G.P. und Damasio A.R. (1999). Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damage. *Neuropsychologia* **37**: 1111-1117.
- Adolphs R., Cahill L., Schul R. und Babinsky R. (1997). Impaired declarative memory for emotional material following bilateral amygdala damage in humans. *Learn. Mem.* **4**: 291-300.
- Aguilar R., Gil L., Flint J., Gray J.A., Dawson G.R., Discroll P., Giménez-Llort A., Escorihuela R.M., Fernández-Teruel A. und Tobena A. (2002). Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: A factor analytic map from a large F<sub>2</sub> intercross of Roman rat strains. *Brain Res. Bull.* **57**: 17-26.
- Akman C., Zhao Q., Liu X. und Holmes G.L. (2004). Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat. *Epilepsy Behav.* **5**: 446-454.
- Alheid G.F. (2003). Extended amygdala and basal forebrain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **985**: 185-205.
- Allen Y.S., Adrian T.E., Allen J.M., Tatemoto K., Crow T.J., Bloom S.R. und Polak J.M. (1983). Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* **221**: 877-879.
- Alleva E., Caprioli A. und Laviola G. (1989). Litter gender composition affects maternal behavior of the primiparous mouse dam (*Mus musculus*). *Comp. Psychol.* **103**: 83-87.
- Alonso S.J., Damas C. und Navarro E. (2000). Behavioral despair in mice after prenatal stress. *J. Physiol. Biochem.* **56**: 77-82.
- Amaral D.G., Price J.L., Pitkänen A. und Carmichael S.T. (1992). Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: Aggleton J.P. (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*, Wiley-Liss, New York, pp. 1-66.
- Amarapanth P., Nader K. und LeDoux J.E. (1999). Lesions of periaqueductal gray dissociate conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. *Learn. Mem.* **6**: 491-499.
- Anisman H., Zaharia M.-D., Meaney M.-J. und Merali Z. (1998). Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J. Dev. Neurosci.* **16**: 149-164.
- Antoniatis E.A. und Mc Donald R.J. (2000). Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. *Behav. Brain Res.* **108**: 1-19.
- Archer J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice : a review. *Anim. Behav.* **21**: 205-235.
- Asan E. (1998). The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **142**: 1-118.
- Atchley W.R., Logsdon T. und Cowley D.E. (1991). Uterine effects, epigenetics, and postnatal skeletal development in the mouse. *Evolution* **45**: 891-909.
- Atkins C.M., Selcher J.C., Petraitis J.J., Trzaskos J.M. und Sweatt J.D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat. Neurosci.* **1**: 602-609.
- Auerbach A.B., Norinsky R., Ho W., Losos K., Guo Q., Chatterjee S. und Joyner A.L. (2003). Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Res.* **12**: 59-69.
- Baimbridge K.G., Celio M.R. und Rodgers J.H. (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS* **15**: 303-308.
- Bale T.L. und Vale W.W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**: 525-557.
- Bannon A.W., Seda J., Carmouche M., Francis J.M., Norman M.H., Karbon B. und McCaleb M.L. (2000). Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice. *Brain Res.* **868**: 79-87.
- Barbazange A., Vallee M., Mayo W., Day J., Simon H., Le Moal M. und Maccari S. (1996). Early and late adoption have different long term effects on male rat offspring. *J. Neurosci.* **16**: 7783-7790.
- Barnard E.A., Skolnick P., Olsen R.W., Mohler H., Sieghart W., Biggio G., Braestrup C., Bateson A.N. und Langer S.Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* **50**: 291-313.
- Bartolomucci A., Gioiosa L., Chirieleison A., Ceresini G., Parmigiani S. und Palanza P. (2004). Cross fostering in mice: behavioral and physiological carry-over effects in adulthood. *Genes Brain Behav.* **3**: 115-122.
- Beatty R.A. (1951). Transplantation of mouse eggs. *Nature* **168**: 995.
- Beaumont H.M. und Smith A.F. (1975). Embryonic mortality during the pre- and post-implantation periods of pregnancy in mature mice after superovulation. *J. Reprod. Fertil.* **45**: 437-448.
- Bechara A., Tranel D., Damasio H., Adolphs R., Rockland C. und Damasio A.R. (1995). Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* **269**: 1115-1118.
- Beck B. (2000). Neuropeptides and obesity. *Nutrition* **16**: 916-923.
- Belzung C. und Griebel G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav. Brain Res.* **125**: 141-149.
- Berglund M.M., Hipskind P.A. und Gehlert D.R. (2003). Recent developments in our understanding of the physiological role of PP-fold peptide receptor subtypes. *Exp. Biol. Med.* **228**: 217-244.

- Bert B., Fink H., Sohr R. und Rex A. (2001). Different effects of diazepam in Fischer rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **70**: 411-420.
- Berton O., Ramos A., Chaouloff F. und Mormède P. (1997). Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: A multivariate analysis of six inbred rat strains. *Behav. Genetics* **27**: 155-166.
- Birke L.J. und Sadler D. (1991). Maternal discrimination and the development of sex differences in exploratory behavior in infant spiny mice (*Acomys cahirinus*). *Q. J. Exp. Psychol.* **43**: 403-430.
- Blair H.T., Schafe G.E., Bauer E.P., Rodrigues S.M. und LeDoux J.E. (2001). Synaptic plasticity in the lateral amygdala: A cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn. Mem.* **8**: 229-242.
- Bliss T.V. und Collingridge G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**: 31-39.
- Bovet-Nitti F., Oliverio A. und Bovet D. (1968). Effects of cross-fostering on avoidance learning and freezing behavior of DBA/2J and C3H/He inbred mice. *Life Sci.* **7**: 791-797.
- Branchi I., Francia N. und Alleva E. (2004). Epigenetic control of neurobehavioural plasticity: the role of neurotrophins. *Behav. Pharmacol.* **15**: 353-362.
- Bredy T.W., Zhang T.Y., Grant R.J., Dioro J. und Meaney M.J. (2004). Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur. J. Neurosci.* **20**: 1355-1362.
- Brioni J.D., Nagahara A.H. und McGaugh J.L. (1989). Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. *Brain Res.* **487**: 105-112.
- Brody S.A. und Geyer M.A. (2004). Interactions of the mGluR5 gene with breeding and maternal factors on startle and prepulse inhibition in mice. *Neurotox. Res.* **6**: 79-90.
- Broks P., Young A.W., Maratos E.J., Coffey P.L., Calder A.J., Isaac C., Mayes A.R., Hodges J.R., Montaldi D., Cezayirli E., Roberts N. und Hadley D. (1998). Face processing impairments after encephalitis: amygdala damage and recognition of fear. *Neuropsychologia* **36**: 59-70.
- Broqua P., Wettstein J.G., Rocher M.N., Gauthier-Martin B. und Junien J.L. (1995). Behavioral effects of neuropeptide Y receptor agonists in the elevated plus-maze and fear-potentiated startle procedures. *Behav. Pharmacol.* **6**: 215-222.
- Broqua P., Wettstein J.G., Gauthier-Martin B. und Junien J.L. (1994). Evaluation of the behavioral effects of peptides related to neuropeptide Y. *Neuropeptides* **26**: 16.
- Brown R.E., Mathieson W.B., Stapleton J. und Neumann P.E. (1999). Maternal behavior in female C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Physiol. Behav.* **67**: 599-605.
- Brumby P.J. (1960). The influence of the maternal environment on growth in mice. *Heredity* **14**: 1-18.
- Bullock A.E., Slobe B.S., Vázquez V. und Collins A.C. (1997). Inbred mouse strains differ in the regulation of startle and prepulse inhibition of the startle response. *Behav. Neurosci.* **111**: 1353-1360.
- Bulman-Fleming B. und Wahlsten D. (1988). Effects of a hybrid maternal environment on brain growth and corpus callosum defects of inbred BALB/c mice: a study using ovarian grafting. *Exp. Neurol.* **99**: 636-646.
- Caesar M., Ostwald J. und Pilz P.K.D. (1989). Startle response measured in muscles innervated by facial and trigeminal nerves show common modulation. *Behav. Neurosci.* **103**: 1075-1081.
- Cahill L. (2000). Modulation of long-term memory storage in humans by emotional arousal: adrenergic activation and the amygdala. In: Aggleton J.P. (Ed.), *The Amygdala: A Functional Analysis*, Oxford University Press, Oxford, pp. 425-445.
- Calatayud F. und Belzung C. (2001). Emotional reactivity in mice, a case of nongenetic heredity? *Physiol. Behav.* **74**: 355-362.
- Calder A.J., Young A.W., Rowland D., Perrett D.I., Hodges J.R. und Etcoff N.L. (1996). Facial emotion recognition after bilateral amygdala damage: differentially severe impairment of fear. *Cogn. Neuropsychol.* **13**: 699-745.
- Caldji C., Dioro J., Anisman H. und Meaney M.J. (2004). Maternal behavior regulates benzodiazepine/GABAA receptor subunit expression in brain regions associated with fear in BALB/c and C57BL/6 mice. *Neuropsychopharmacology* **29**: 1344-1352.
- Caldji C., Dioro J. und Meaney M.J. (2003). Variations in maternal care alter GABA(A) receptor subunit expression in brain regions associated with fear. *Neuropsychopharmacology* **28**: 1950-1959.
- Caldji C., Francis D. und Sharma S. (2000). The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* **22**: 219-229.
- Caldji C., Tannenbaum B., Sharma S., Francis D., Plotsky P.M. und Meaney M.J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5335-5340.
- Campeau S. und Davis M. (1995). Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J. Neurosci.* **15**: 2312-2327.

- Carlier M., Roubertoux P.L. und Wahlsten D. (1999). Maternal effect in behavior genetic analysis. In: Jones B.C. und Mormède O. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics. Methods and Applications*, CRC Press, Boca Raton, pp. 187-200.
- Carlier M., Nosten-Bertrand M. und Michard-Vanhée C. (1992). Separating genetic effects from maternal environmental effects. In: Goldowitz D., Wahlsten D. und Wimer R.E. (Eds.), *Techniques for the genetic analysis of brain and behavior*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp.111-122.
- Carlier M., Roubertoux P. und Cohen-Salmon C. (1983). Early development in mice: I. Genotype and postnatal maternal effects. *Physiol. Behav.* **30**: 837-844.
- Carlier M., Roubertoux P. und Cohen-Salmon C. (1982). Differences in patterns of pup care in *Mus musculus domesticus*. I. Comparisons between eleven inbred strains. *Behav. Neurol. Biol.* **35**: 205-210.
- Carlsen J. (1988). Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat basolateral amygdaloid nucleus, with special reference to GABAergic innervation of amygdalostriatal projection neurons. *J. Comp. Neurol.* **273**: 513-526.
- Carlsen J. und Heimer L. (1988). The basolateral amygdaloid complex as a cortical-like structure. *Brain Res.* **441**: 377-380.
- Carlson S. und Willott J.F. (1998). Caudal pontine reticular formation of C57BL/6J mice: responses to startle stimuli, inhibition by tones, and plasticity. *J. Neurophysiol.* **79**: 2603-2614.
- Carlson S., Falls W.A., Turner J.G., Webster S.E. und Willott J.F. (1996). Fear-potentiated startle (FPS) in three inbred mouse strains. *Soc. Neurosci. Abstr.* **22**: 1115.
- Carola V., D'Olimpio F., Brunamonti E., Mangia F. und Renzi P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. *Behav. Brain Res.* **134**: 49-57.
- Carrié I., Clément M., DeJavel D., Francès H. und Bourre J.M. (2000). Phospholipid supplementation reverses behavioural and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J. Lipid Res.* **41**: 473-480.
- Carthew P., Wood M.J. und Kirby C. (1985). Pathogenicity of mouse hepatitis virus for preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* **73**: 207-213.
- Cassell M.D., Freedman L.J. und Shi C. (1999). The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **877**: 217-241.
- Celio M.R. (1990). Calbindin-D<sub>28k</sub> and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**: 375-475.
- Celio M.R. und Heizmann C.W. (1981). Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature* **293**: 300-302.
- Champagne F.A., Francis D.D., Mar A. und Meaney M.J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol. Behav.* **79**: 359-371.
- Champagne F., Diorio J., Sharma S. und Meaney M.J. (2001). Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin-receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 12736-12741.
- Champagne F. und Meaney M.J. (2001). Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. *Prog. Brain Res.* **133**: 287-302.
- Champagne F. und Meaney M.J. (2000). Gestational stress effects on maternal behavior. *Abstr. Soc. Neurosci.* **26**: 2035.
- Champlin A.K., Dorr D.L. und Gates A.H. (1973). Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol. Reprod.* **8**: 491-494.
- Chapillon P., Patin V., Roy V., Vincent A. und Caston J. (2002). Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional and cognitive aspects in rodents: a review. *Dev. Psychobiol.* **41**: 373-387.
- Chapillon P., Manneche C., Belzung C. und Caston J. (1999). Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice : I. Effects on emotional reactivity. *Behav. Genet.* **29**: 41-46.
- Chapman W.P., Schroeder H.R., Geyer G., Brazier M.A.B., Fager C., Poppeu J.L., Solomon H.C. und Yakolev P.L. (1954). Physiological evidence concerning the importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulating function and emotion in man. *Science* **129**: 949-950.
- Chin H.J. und Wang C.-K.L. (2001). Utero-tubal transfer of mouse embryos. *Genesis* **30**: 77-81.
- Cierpial M.A. und McCarthy R. (1991). Adult blood pressure reduction in spontaneously hypertensive rats reared by normotensive Sprague-Dawley mothers. *Behav. Neural. Biol.* **56**: 262-270.
- Cierpial M.A., Shasby D.E., Murphy C.A., Barom A.H., Stewart R.E., Swithers S.E. und McCarthy R. (1989). Open-field behavior of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats: Effects of reciprocal cross-fostering of litters. *Behav. Neural. Biol.* **51**: 203-210.
- Clayton E.C. und Williams C.L. (2000). Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* **112**: 151-158.
- Clément Y., Calatayud F. und Belzung C. (2002). Genetic basis of anxiety-like behavior: A critical review. *Brain Res. Bull.* **57**: 57-71.
- Clément Y., Bondoux D., Launay J.M. und Chapouthier G. (1997). Convulsive effects of a benzodiazepine receptor inverse agonist: Are they related with anxiogenic processes? *J. Physiol. (Paris)* **91**: 21-29.

- Cliffer K.D., Burstein R. und Giesler Jr. G.J. (1991). Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. *J. Neurosci.* **11**: 852-868.
- Combelles C.M.H. und Albertini D.F. (2003). Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. *Biol. Reprod.* **68**: 812-821.
- Cook M.N. und Bolivar V.J. (2002). Behavioral differences among 129 substrains: implications for knockout and transgenic mice. *Behav. Neurosci.* **116**: 600-611.
- Cousens G. und Otto T. (1998). Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* **112**: 1092-1103.
- Cowley D.E., Pomp D., Atchley W.R., Eisen E.J. und Hawkins-Brown D. (1989). The impact of maternal uterine genotype on postnatal growth and adult body size in mice. *Genetics* **122**: 193-203.
- Crabbe J.C. und Phillips T.J. (2003). Mother nature meets mother nurture. *Nature Neurosci.* **6**: 440-442.
- Crabbe J.C., Wahlsten D. und Dudek B.C. (1999). Genetics of mouse behavior: Interactions with laboratory environment. *Science* **284**: 1670-1672.
- Craig A., Bushnell M., Zhang E. und Blomqvist A. (1994). A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature* **372**: 770-773.
- Crawley J.N., Belknap J.K., Collins A., Crabbe J.C., Frankel W., Henderson N., Hitzemann R.J., Maxson S.C., Miner L.L., Silva A.J., Wehner J.M., Wynshaw-Boris A. und Paylor R. (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* **132**: 107-124.
- Crusio W.E. und Schmitt A. (1996). Prenatal effects of parity on behavioral ontogeny in mice. *Physiol. Behav.* **59**: 1171-1174.
- Cruz A.P.M., Frei F. und Graeff F.G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **49**: 171-176.
- Dado R. und Giesler G.J. (1990). Afferent input to nucleus submedialis in rats: retrograde labeling of neurons in the spinal cord and caudal medulla. *J. Neurosci.* **10**: 2672-2686.
- Dalmaz C., Introini-Collison L.B. und McGaugh J.L. (1993). Noradrenergic and cholinergic interactions in the amygdala and the modulation of memory storage. *Behav. Brain Res.* **58**: 167-174.
- Dalvi A. und Rodgers R.J. (1996). GABAergic influences on plus-maze behavior in mice. *Psychopharmacology* **128**: 380-397.
- D'Amato F.R., Cabib S., Ventura R. und Orsini C. (1998). Long-term effects of postnatal manipulation on emotionality are prevented by maternal anxiolytic treatment in mice. *Dev. Psychobiol.* **32**: 225-234.
- Davis M. und Whalen P.J. (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Mol. Psychiatry* **6**: 13-34.
- Davis M. (2000). The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In: Aggleton J.P. (Ed.), *The Amygdala: A Functional Analysis*, Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 213-287.
- Davis M. und Shi C. (1999). The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **877**: 281-291.
- Davis M. (1998). Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol. Psychiatry* **44**: 1239-1247.
- Davis M. (1997). Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J. Neuropsych. Clin. Neurosci.* **9**: 382-402.
- Davis M., Walker D.L. und Lee Y. (1997). Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **352**: 1675-1687.
- Davis M., Rainnie D. und Cassell M. (1994). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *TINS* **17**: 208-214.
- Davis M., Falls W.W., Campeau S. und Kim M. (1993). Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav. Brain Res.* **58**: 175-198.
- Davis M. (1989). Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock. *Behav. Neurosci.* **103**: 495-503.
- Dawson G.R. und Tricklebank M.D. (1995). Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *Pharmacol. Sci.* **16**: 33-36.
- DeFries J.C., Gervais M.C. und Thomas E.A. (1978). Response to 30 generations of selection for open-field activity in laboratory mice. *Behav. Genet.* **8**: 3-13.
- De Fries J.C., Thomas E.A., Hegmann J.P. und Weir M.W. (1967). Open-field behavior in mice: analysis of maternal effects by means of ovarian transplantation. *Psychonom. Sci.* **8**: 207-208.
- De Kloet E.R., Sibug R.M., Helmerhorst F.M. und Schmidt M. (2005). Stress, genes and the mechanisms of programming the brain for later life. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**: 271-281.
- Denenberg V.H., Goplight B., Sherman G.F. und Mobraaten L.E. (2001). Effects of the uterine environment and neocortical ectopias upon behavior of BXS<sup>B</sup>-Yaa<sup>+</sup> mice. *Dev. Psychobiol.* **38**: 154-163.
- Denenberg V.H. (1999). Commentary: Is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy? *Dev. Psychobiol.* **34**: 1-3.
- Denenberg V.H., Hoplight B.J. und Mobraaten L.E. (1998). The uterine environment enhances cognitive competence. *Neuroreport* **9**: 1667-1671.

- Denenberg V.H., Mobraaten L.E., Sherman G.F., Morrison L., Schrott L.M., Waters N.S., Rosen G.D. und Galaburda A.M. (1991). Effects of autoimmune uterine/maternal environment upon cortical ectopia, behavior and autoimmunity. *Brain Res.* **563**: 114-122.
- De Olmos J.S. und Heimer L. (1999). The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **877**: 1-32.
- De Quidt M.E. und Emson P.C. (1986a). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system - II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **18**: 545-618.
- De Quidt M.E. und Emson P.C. (1986b). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system - I. Radioimmunoassay and chromatographic characterisation. *Neuroscience* **18**: 527-543.
- Diorio J., Weaver I.C.G. und Meaney M.J. (2000). A DNA array study of hippocampal gene expression regulated by maternal behavior in infancy. *Soc. Neurosci. Abstr.* **26**: 1366.
- Dirks A., de Jongh R., Groenink L., van der Gugten J., Hijzen T.H. und Olivier B. (2001). Footshock-induced sensitization of the acoustic startle response in two strains of mice. *Behav. Brain Res.* **123**: 17-21.
- Doron N.N. und LeDoux J.E. (1999). Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* **412**: 383-409.
- Doyle L.L., Gates A.H. und Noyes R.W. (1963). Asynchronous transfer of mouse ova. *Fertil. Steril.* **14**: 215-225.
- Dulioust E., Toyama K., Busnel M.C., Moutier R., Carlier M., Marchaland C., Ducot B., Roubertoux P. und Aurox M. (1995). Long-term effects of embryo freezing in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 589-593.
- Ecker D.J., Stein P., Xu Z., Williams C.J., Kopf G.S., Bilker W.B., Abel T. und Schultz R.M. (2004). Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 1595-1600.
- Elbing L. und Colot M. (1987). Persistence of SCE-inducing damage in mouse embryos and fetuses following superovulation in mice. *Mutat. Res.* **176**: 117-122.
- Elbing L. und Colot M. (1985). Abnormal development and transport and increased sister chromatid exchange in preimplantation embryos following superovulation in mice. *Mutat. Res.* **147**: 189-195.
- Elmazar M.M.A., Vogel R. und Spielmann H. (1989). Maternal factors influencing development of embryos from mice superovulated with gonadotropins. *Reprod. Toxicology* **3**: 135-138.
- Erkadius E., Morgan T.O. und DiNicolantonio R. (1996). Full expression of the exaggerated salt appetite of the spontaneously hypertensive rat requires a prenatal factor. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23**: 619-620.
- Erlander M.G., Tillakaratne N.J., Feldblum S., Patel N. und Tobin A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* **7**: 91-100.
- Ernst C.A., Rhees B.K., Miao C.H. und Atchley W.R. (2000). Effect of long-term selection for early postnatal growth rate on survival and prenatal development of transferred mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* **118**: 205-210.
- Ertzeid G. und Storeng R. (2001). The impact of ovulation stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum. Reprod.* **16**: 221-225.
- Ertzeid G., Storeng R. und Lyberg T. (1993). Treatment with gonadotropins impaired implantation and fetal development in mice. *J. Assist. Reprod. Genet.* **10**: 286-291.
- Ertzeid G. und Storeng R. (1992). Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and post-implantation development in mice. *J. Reprod. Fertil.* **96**: 649-655.
- Eva C., Mele P., Oberto A., Panzica G., Pisu M.G. und Serra M. (2004). Neuroanatomical and pharmacological evidence for a functional interaction between GABAergic and NPY-Y1 transmission in the amygdala of Y1R/LacZ transgenic mice. *Crit. Rev. Neurobiol.* **16**: 33-41.
- Falls W.A., Carlson S., Turner J.G. und Willott J.F. (1997). Fear-potentiated startle in two strains of inbred mice. *Behav. Neurosci.* **111**: 855-861.
- Fanselow M.S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav. Brain Res.* **110**: 73-81.
- Fanselow M.S. und LeDoux J.E. (1999). Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* **23**: 229-232.
- Fanselow M.S. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonom. Bull. Rev.* **1**: 429-438.
- Feindel W. und Penfield W. (1954). Localization of discharge in temporal lobe automatism. *Neurol. Psych.* **72**: 603-630.
- Fendt M. und Fanselow M.S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**: 743-760.
- Fendt M., Koch M. und Schnitzler H.-U. (1996). Lesions of the central grey block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behav. Brain Res.* **74**: 127-134.
- Fendt M., Koch M. und Schnitzler H.-U. (1994a). Lesions of the central gray block the sensitization of the acoustic startle response in rats. *Brain Res.* **661**: 163-173.
- Fendt M., Koch M. und Schnitzler H.-U. (1994b). Amygdaloid noradrenaline is involved in the sensitization of the acoustic startle reflex. *Pharmac. Biochem. Behav.* **48**: 307-314.

- Fernández-Gonzalez R., Moreira P., Bilbao A., Jiménez A., Pérez-Crespo M., Ramírez M.A., De Fonseca F.R., Pitando P. und Gutiérrez-Adán A. (2004). Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 5880-5885.
- Ferry B. und McGaugh J.L. (2000). Role of amygdala norepinephrine in mediating stress hormone regulation of memory storage. *Acta Pharmacol. Sin.* **21**: 481-493.
- Ferry B. und McGaugh J.L. (1999). Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol. Learn. Mem.* **72**: 8-12.
- File S.E. (2001). Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav. Brain Res.* **125**: 151-157.
- File S.E., Gonzalez L.E. und Gallant R. (1998). Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology* **19**: 397-405.
- Finn D.A., Rutledge-Gorman M.T. und Crabbe J.C. (2003). Genetic animal models of anxiety. *Neurogenetics* **4**: 109-135.
- Fisher D.L. und Smithberg M. (1973). Host-transplant relationship of cultured mouse embryos. *J. Exp. Zool.* **183**: 263-266.
- Flaherty C.F., Greenwood A., Martin J. und Leszczuk M. (1998). Relationship of negative contrast to animal models of fear and anxiety. *Anim. Learn. Behav.* **26**: 397-407.
- Fleming A.S., O'Day D.H. und Kraemer G.W (1999). Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**: 673-685.
- Flint J. (2003). Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *J. Neurobiol.* **54**: 46-77.
- Flood J.F., Baker M.L., Hernandez E.N. und Morley J.E. (1989). Modulation of memory processing by neuropeptide Y varies with brain injection site. *Brain Res.* **503**: 73-82.
- Fonseca E.S., Massoco C.O. und Palermo-Neto J. (2002). Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiol. Behav.* **77**: 205-215.
- Francis D.D., Szegda K., Campbell G., Martin W.D. und Insel T.R. (2003). Epigenetic sources of behavioral differences in mice. *Nature Neurosci.* **6**: 445-446.
- Francis D.D., Champagne F. und Meaney M.J. (2000). Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J. Neuroendocrinol.* **12**: 1145-1148.
- Francis D., Diorio J., Lin D. und Meaney M.J. (1999). Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* **286**: 1155-1158.
- Frankel W.N. (1998). Mouse strain backgrounds: more than black and white. *Neuron* **20**: 183.
- Frankland P.W. und Yeomans J.S. (1995). Fear-potentiated startle and electrically evoked startle mediated by synapses in rostralateral midbrain. *Behav. Neurosci.* **109**: 669-680.
- Fries E., Moragues N., Caldji C., Hellhammer D.H. und Meaney M.J. (2004). Preliminary evidence of altered sensitivity to benzodiazepines as a function of maternal care in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1032**: 320-323.
- Gallagher M., Rapp P.S. und Fanelli R.J. (1985). Opiate antagonist facilitation of time-dependent memory processes: dependence upon intact norepinephrine function. *Brain Res.* **347**: 284-290.
- Gardner D.K., Rodriegez-Martinez H. und Lane M. (1999). Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod.* **14**: 2575-2580.
- Gerald C., Walker M.W., Criscione L., Gustafson E.L., Batzl-Hartmann C., Smith K.E., Vaysse P., Durkin M.N., Laz T.M., Linemeyer D.L., Schaffhauser A.O., Whitebread S., Hofbauer K.G., Taber R.I., Branchek T.A. und Weinshank R.L. (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide Y- induced food intake. *Nature* **382**: 168-171.
- Gerlai R. (2001). Gene targeting: technical confounds and potential solutions in behavioral brain research. *Behav. Brain Res.* **125**: 13-21.
- Gewirtz J.C. und Davis M. (1997). Second-order fear conditioning prevented by blocking NMDA receptors in amygdala. *Nature* **388**: 471-474.
- Gingrich J.A. und Hen R. (2000). The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**: 146-152.
- Glenister P.H. und Thornton C.E. (2000). Cryoconservation – archiving for the future. *Mamm. Genome* **11**: 565-571.
- Gloor P. (1992). Role of the amygdala in temporal lobe epilepsy. In: Aggleton J.P. (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*, Wiley-Liss, New York, pp. 505-538.
- Goldstein L.E., Rasmusson A.M., Bunney B.S. und Roth R.H. (1996). Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J. Neurosci.* **16**: 4787-4798.
- Goma M. und Tobena A. (1978). Reliability of various measures obtained in open-field test. *Psychol. Rep.* **43**: 1123-1128.

- Gomez-Serrano M., Tonelli L., Listwak S., Sternberg E. und Riley A.L. (2001). Effects of cross fostering on open-field behavior, acoustic startle, lipopolysaccharide-induced corticosterone release and body weight in Lewin and Fischer rats. *Behav. Genetics* **31**: 427-436.
- Goosens K.A., Holt W. und Maren S. (2000). A role for amygdaloid PKA and PKC in the acquisition of long-term conditional fear memories in rats. *Behav. Brain Res.* **114**: 145-152.
- Goto Y., Nada Y., Shiotani M., Kishi J., Nonogaki T., und Mori T. (1993). The fate of embryos transferred into the uterus. *J. Assist. Reprod. Genet.* **10**: 197-201.
- Goto Y., Nada Y., Narimoto K., Todura T. und Mori T. (1992). Pregnancy achieved by transferring blastocysts into endometrial stroma in mice. *Hum. Reprod.* **7**: 681-684.
- Gray T.S. und Morley J.E. (1986). Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sci.* **38**: 389-401.
- Green S. und Vale A.L. (1992). Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic effects of benzodiazepines in rats. *Behav. Pharmacol.* **3**: 261-264.
- Griebel G., Moindrot N., Aliaga C., Simiand J. und Soubrie P. (2001). Characterization of the profile of neurokinin-2 and neurotensin receptor antagonists in the mouse defense test battery. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **25**: 619-626.
- Griebel G., Belzung C., Perrault G. und Sanger D.J. (2000). Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology* **148**: 164-170.
- Griebel G. (1999). Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacol. Ther.* **82**: 1-61.
- Griebel G., Sanger D.J. und Perrault G. (1996a). The use of the elevated plus-maze to discriminate between non-selective and BZ-1 ( $\omega_1$ ) selective benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology (Berlin)* **124**: 245-254.
- Griebel G., Blanchard D.C. und Blanchard R.J. (1996b). Evidence that the behaviors in the mouse defence test battery relate to different emotional states: a factor analytic study. *Physiol. Behav.* **60**: 1255-1260.
- Gustafson E.L., Card P.L. und Moore R.Y. (1986). Neuropeptide Y localization in the rat amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* **251**: 349-362.
- Hall C.S. (1934). Drive and emotionality factors associated with adjustment in the rat. *J. Comp. Psychol.* **17** : 89-108.
- Handley S.L. und McBlane J.W. (1993). An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **29**: 129-138.
- Heilig M. (1995). Antisense inhibition of neuropeptide Y (NPY)-Y1 receptor expression blocks the anxiolytic-like action of NPY in amygdala and paradoxically increases feeding. *Regul. Pept.* **59**: 201-205.
- Heilig M. und Widerlov E. (1995). Neurobiology and clinical aspects of neuropeptide Y. *Crit. Rev. Neurobiol.* **9**: 115-136.
- Heilig M., Soderpalm B., Engel J.A. und Widerlov E. (1989). Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models. *Psychopharmacology* **98**: 524-529.
- Heilig M. und Murison R. (1987). Intracerebroventricular neuropeptide Y suppresses open field and home cage activity in the rat. *Regul. Pept.* **19**: 221-231.
- Helton D.R., Tizzano J.P., Monn J.A., Schoepp D.D. und Kallman M.J. (1998). Anxiolytic and side-effect profile of LY354740, a potent, highly selective, orally active agonist for group II metabotropic glutamate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**: 651-660.
- Herbert H., Klepper A. und Ostwald J. (1997). Afferent and efferent connections of the ventrolateral tegmental area in the rat. *Anat. Embryol.* **196**: 235-259.
- Herranz R. (2003). Cholecystokinin antagonists: pharmacological and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* **23**: 559-605.
- Hitchcock J.M. und Davis M. (1991). Efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* **105**: 826-842.
- Hitchcock J.M., Sananes C.B. und Davis M. (1989). Sensitization of the startle reflex by footshock: blockade by lesions of the central nucleus of the amygdala or its efferent pathway to the brainstem. *Behav. Neurosci.* **3**: 509-518.
- Hitchcock J. und Davis M. (1986). Lesions of the amygdala but not of the cerebellum or red nucleus block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* **100**: 11-22.
- Hofker M.H. und Breuer M. (1998). Generation of transgenic mice. *Methods Mol. Biol.* **110**: 63-78.
- Hogg S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**: 21-30.
- Hokfelt T., Broberger C., Zhang X., Diez M., Kopp J., Xu Z.-Q., Landry M., Bao L., Schalling M., Koistinaho J., DeArmond S.J., Prusiner S., Gong J. und Walsh J.H. (1998). Neuropeptide Y: some viewpoints on a multifaceted peptide in the normal and diseased nervous system. *Brain Res. Rev.* **26**: 154-166.
- Holsboer F. (2003). The role of peptides in treatment of psychiatric disorders. *J. Neural. Transm.* **64**: 17-34.
- Homanics G.E., Quinlan J.J. und Firestone L.L. (1999). Pharmacologic and behavioral responses of inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mouse lines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **63**: 21-26.

- Honkaniemi J., Pelto-Huikko M., Richardt L., Isola J., Lammi A., Fuxi K., Gustafsson J.A., Wikström A.C. und Hokfelt T. (1992). Colocalization of peptide and glucocorticoid receptor immunoreactivities in rat central amygdaloid nucleus. *Neuroendocrinology* **55**: 451-459.
- Huot R.L., Thiruvikraman K.V., Meaney M.J. und Plotsky P.M. (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berlin)* **158**: 366-373.
- Isles A.R. and Lawrence S.W. (2000). Imprinted genes, cognition and behaviour. *Trends Cogn. Sci.* **4**: 309-318.
- Jessa M., Nazar M., Bidzinski A. und Plaznik A. (1996). The effects of repeated administration of diazepam, MK-801 and CGP 37849 on rat behavior in two animal models of anxiety. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **6**: 55-61.
- Jiménez-Vasquez P.A., Mathé A.A., Thomas J.D., Riley E.P. und Ehlers C.L. (2001). Early maternal separation alters neuropeptide Y concentrations in selected brain regions in adult rats. *Dev. Brain Res.* **131**: 149-152.
- Johnston A.L. und File S.E. (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.* **49**: 245-250.
- Kandler K. und Herbert H. (1991). Auditory projections from the cochlear nucleus to pontine and mesencephalic reticular nuclei in the rat. *Brain Res.* **562**: 230-242.
- Karl T., Pabst R. und von Hörsten S. (2003). Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp. Toxic. Pathol.* **55**: 69-83.
- Kash S.F., Tecott L.H., Hodge C. und Baekkeskov S. (1999). Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 1698-1703.
- Kask A., Harro J., von Hörsten S., Redrobe J.P., Dumont Y. und Quirion R. (2002). The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like effects of neuropeptide Y. *Neurosci. Behav. Rev.* **26**: 259-283.
- Kask A. und Harro J. (2000). Inhibition of amphetamine- and apomorphine-induced behavioural effects by neuropeptide Y Y(1) receptor antagonist BIBO 2204. *Neuropharmacology* **39**: 1292-1302.
- Kask A., Rago L. und Harro J. (1997). Alpha-helical CRF (9-41) prevents anxiogenic-like effect of NPY Y-1 receptor antagonist BIBP3226 in rats. *Neuroreport* **8**: 3645-3647.
- Kask A., Rago L. und Harro J. (1996). Anxiogenic-like effect of the neuropeptide Y Y-1 receptor antagonist BIBP3226: antagonism with diazepam. *Eur. J. Pharmacol.* **317**: R3-R4.
- Kempainen S. und Pitkänen A. (2000). Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D<sub>28k</sub> immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with  $\gamma$ -aminobutyric acid. *J. Comp. Neurol.* **426**: 441-467.
- Kim M., Campeau S., Falls W.A. und Davis M. (1993). Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression of fear-potentiated startle. *Behav. Neural. Biol.* **59**: 5-8.
- Kinsley C. und Svare B. (1987). Genotype modulates prenatal stress effects on aggression in male and female mice. *Behav. Neural. Biol.* **47**: 138-150.
- Kirby D.A., Koerber S.C., May J.M., Hagaman C., Cullen M.J., Pellemounter M.A. und Rivier J.E. (1995). Y<sub>1</sub> and Y<sub>2</sub> receptor selective neuropeptide Y analogues: evidence for a Y<sub>1</sub> receptor subclass. *J. Med. Chem.* **38**: 4579-4586.
- Kitabgi P. (2002). Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **5**: 764-776.
- Klapstein G.J. und Colmers W.F. (1993). One the sites of presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampus in vitro. *Hippocampus* **3**: 103-112.
- Klemfuss H., Southerland S. und Britton K.T. (1998). Cardiovascular actions of neuropeptide Y und social stress. *Peptides* **19**: 85-92.
- Klodzinska A., Chojnacka-Wojcik E., Palucha A., Branski P., Popik P. und Pilc A. (1999). Potential anti-anxiety, anti-addictive effects of LY354740, a selective group II glutamate metabotropic receptors agonist in animal models. *Neuropharmacology* **38**: 1831-1839.
- Klüver H. und Bucy P.C. (1937). „Psychic blindness“ and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am. J. Physiol.* **119**: 352-353.
- Klüver H. und Bucy P.C. (1934). Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch. Neurol. Psychiatr.* **42**: 979-1000.
- Koch M. (1999). The neurobiology of startle. *Progr. Neurobiol.* **59**: 107-128.
- Koch M. und Schnitzler H.-U. (1997). The acoustic startle response in rats – circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav. Brain Res.* **89**: 35-49.
- Koch M. und Ebert U. (1993). Enhancement of the acoustic startle response by stimulation of an excitatory pathway from the central amygdala/basal nucleus of Meynert to the pontine reticular formation. *Exp. Brain Res.* **93**: 231-241.
- Kopchia K.L., Altman H.J. und Comissaris R.L. (1992). Effects of lesions of the central nucleus of the amygdala on anxiety-like behaviors in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **43**: 453-461.
- Korte S.M. und De Boer S. (2003). A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* **463**: 163-185.
- Kovacs M.S., Lowe L. und Kuehn M.R. (1993). Use of superovulated mice as embryo donors for ES cell injection chimeras. *Lab. Anim. Sci.* **43**: 91-93.

- Krysiak R., Obuchowicz E. und Herman Z.S. (2000). Conditioned fear-induced changes in neuropeptide Y-like immunoreactivity in rats: the effect of diazepam and buspirone. *Neuropeptides* **34**: 148-157.
- LaBar K.S., LeDoux J.E., Spencer D.D. und Phelps E.A. (1995). Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *Neuroscience* **15**: 6846-6855.
- La Barba R.C. und White J.L. (1971). Litter size variations and emotional reactivity in BALB/c mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **75**: 254-257.
- Ladd C.O., Huot R.L., Thirvikraman K.V., Nemeroff C.B., Meaney M.J. und Plostky P.M. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog. Brain Res.* **122**: 81-103.
- Lamberty Y. und Gower A.J. (1996). Arm width and brightness modulation of spontaneous behavior of two strains of mice tested in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* **59**: 439-444.
- Landgraf R. (2001). Neuropeptides and anxiety-related behavior. *Endocr. J.* **48**: 517-533.
- Latham K.E. (1999). Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *Int. Rev. Cytol.* **193**: 71-124.
- Läuter J. (1996). Exact t and F tests for analysing studies with multiple endpoints. *Biometrics* **52**: 964-970.
- Läuter J., Kropf S. und Glimm E. (1995). Neue Testmethoden zur Analyse von Studien mit multipltem Endpunkt. Verbindung exploratorischer und konformatorischer Techniken. In: Trampisch H.J. und Lange S. (Eds.), *Medizinische Forschung, Ärztliches Handeln. 40. Jahrestagung der GMDs, MMVS Medizin, München*, pp. 152-155.
- LeDoux J.E. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Mol. Neurobiol.* **23**: 727-738.
- LeDoux J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**: 155-184.
- LeDoux J.E. (1998). Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol. Psychiatry* **44**: 1229-1238.
- LeDoux J.E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Annu. Rev. Psychol.* **46**: 209-235.
- LeDoux J.E., Farb C.R. und Milner T.A. (1991). Ultrastructure and synaptic associations of auditory thalamo-amygdala projections in the rat. *Exp. Brain Res.* **85**: 577-586.
- LeDoux J.E., Romanski L. und Xagoraris A. (1989). Indelibility of subcortical emotional memories. *J. Cogn. Neurosci.* **1**: 238-243.
- LeDoux J.E., Iwata J., Cicchetti P. und Reis D.J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.* **8**: 2517-2529.
- LeDoux J.E., Ruggiero D.A., Forest R., Stornetta R. und Reis D.J. (1987). Topographic organization of convergent projections to the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* **264**: 123-146.
- Lee D.R., Lee Y.E., Yoon H.S., Lee H.-J., Kim M.K. und Roh S.J. (1997). The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos. *Hum. Reprod.* **12**: 2493-2498.
- Lee Y., Lopez D.E., Meloni E.G. und Davis M. (1996). A primary acoustic startle pathway: obligatory role for cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J. Neurosci.* **16**: 3775-3789.
- Lefebvre L., Viville S., Barton S.C., Ishino F., Keverne E.B. und Surani M.A. (1998). Abnormal maternal behavior and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. *Nat. Genet.* **20**: 163-169.
- LeGal La Salle G., Paxinos G., Emson P. und Ben-Ari Y. (1978). Neurochemical mapping of GABAergic systems in the amygdaloid complex and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.* **155**: 397-403.
- LeRoy J., Carlier M. und Roubertoux P.L. (2001). Sensory and motor development in mice: genes, environment and their interactions. *Behav. Brain Res.* **125**: 57-64.
- Li R., Nishijo H., Ono T., Ohtani Y. und Ohtani O. (2002). Synapses on GABAergic neurons in the basolateral nucleus of the rat amygdala: double-labeling immunoelectron microscopy. *Synapse* **43**: 42-50.
- Li X.F., Stutzmann G.E. und LeDoux J.E. (1996). Convergent but temporally separated inputs to lateral amygdala neurons from the auditory thalamus and auditory cortex use different postsynaptic receptors: in vivo intracellular and extracellular recordings in fear conditioning pathways. *Learn. Mem.* **3**: 229-242.
- Lingenhöhl K. und Friauf E. (1994). Giant neurons in the rat reticular formation: a sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? *J. Neurosci.* **14**: 1176-1194.
- Lister R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* **92**: 180-185.
- Liu D., Diorio J., Day J.C., Francis D.D. und Meaney M.J. (2000). Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat. Neurosci.* **3**: 799-806.
- Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Darlene F., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky A. und Meaney M.J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* **277**: 1659-1662.
- Liu H.-C., Cohen J., Alikani M., Noyes N. und Rosenwaks Z. (1993). Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fert. Steril.* **60**: 871-875.
- Logue S.F., Owen E.H., Rasmussen D.L. und Wehner J.M. (1997). Assessment of locomotor activity, acoustic and tactile startle, and prepulse inhibition of startle in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene and quantitative trait loci analysis. *Neuroscience* **80**: 1075-1086.
- Luckett D.C. und Mukherjee A.B. (1986). Embryonic characteristics in superovulated mouse strains: comparative analyses of the incidence of chromosomal aberrations, morphological malformations and mortality of embryos from two strains of superovulated mice. *J. Hered.* **77**: 39-42.

- Maccari S., Piazza P.V., Kabbaj M., Barbazanges A., Simon H. und Le Moal M. (1995). Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J. Neurosci.* **15**: 110-116.
- Macdonald R.L. und Olsen R.W. (1994). GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**: 569-602.
- Majidishad P., Pelli D.G. und LeDoux J.E. (1996). Disruption of fear conditioning to contextual stimuli but not to a tone by lesions of the accessory basal nucleus of the amygdala. *Soc. Neurosci. Abstr.* **22**: 1116.
- Manning C.J., Dewsbury D.A., Wakeland E.K. und Potts W.K. (1995). Communal nesting and communal nursing in house mice, *Mus musculus domesticus*. *Anim. Behav.* **50**: 741-751.
- Manning C.J., Wakeland E.K. und Potts W.K. (1992). Communal nesting patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. *Nature* **360**: 581-583.
- Maren S. und Quirk G.J. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 844-852.
- Maren S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 897-931.
- Maren S. (2000). Auditory fear conditioning increases CS-elicited spike firing in lateral amygdala neurons even after extensive overtraining. *Eur. J. Neurosci.* **12**: 4047-4054.
- Maren S. (1999). Neurotoxic or electrolytic lesions of the ventral subiculum produce deficits in the acquisition and expression of Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav. Neurosci.* **113**: 283-290.
- Maren S., Aharonov G. und Fanselow M.S. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav. Brain Res.* **88**: 261-274.
- Maren S., Aharonov G. und Fanselow M.S. (1996). Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. *Behav. Neurosci.* **110**: 718-726.
- Maren S. und Fanselow M.S. (1996). The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron* **16**: 237-240.
- Maren S. und Baudry M. (1995). Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationship to learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **63**: 1-18.
- Markel A.L., Galaktionov Y.u.K. und Efimov V.M. (1989). Factor analysis of rat behavior in an open field test. *Neurosci. Behav. Physiol.* **19**: 279-286.
- Martin D.L., Martin S.B., Wu S.J. und Espina N. (1991). Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase (GAD): the apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J. Neurosci.* **11**: 2725-2731.
- Maxson S.C. und Trattner A. (1981). Interaction of genotype and fostering in the development of behavior of DBA and C57 mice. *Behav. Genet.* **11**: 153-165.
- McDonald A.J. und Mascagni F. (2004). Parvalbumin-containing interneurons of the basolateral amygdala express high levels of the  $\alpha 1$  subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor. *J. Comp. Neurol.* **473**: 137-146.
- McDonald A.J. und Betette R.L. (2001). Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and co-localization of calbinbin-D<sub>28k</sub>. *Neuroscience* **102**: 413-425.
- McDonald A.J. und Mascagni F. (2001). Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* **105**: 681-693.
- McDonald A.J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progr. Neurobiol.* **55**: 257-332.
- McDonald A.J. (1996). Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuits. *J. Comp. Neurol.* **365**: 367-369.
- McDonald A.J. und Mascagni F. (1996). Cortico-cortical and cortico-amygdaloid projections of the rat occipital cortex: a *phaseolus vulgaris* leucoagglutinin study. *Neuroscience* **71**: 37-54.
- McDonald A.J. (1994). Calretinin immunoreactive neurons in the basolateral amygdala of the rat and monkey. *Brain Res.* **667**: 238-242.
- McDonald A.J. (1992). Cell types and intrinsic connections of the amygdala. In: Aggleton J.P. (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*, Wiley-Liss, New York, pp. 67-96.
- McDonald A.J. und Baimbridge K.G. (1990). Calcium binding protein containing neurons of the basolateral amygdala also exhibit GABA and cytochrome oxidase immunoreactivity. *Soc. Neurosci. Abstr.* **16**: 181.15.
- McDonald A.J. (1989). Coexistence of somatostatin with neuropeptide Y, but not with cholecystokinin or vasoactive intestinal peptide, in neurons of the rat amygdala. *Brain Res.* **500**: 37-45.
- McDonald A.J. und Pearson J.C. (1989). Coexistence of GABA and peptide immunoreactivity in non-pyramidal neurons of the basolateral amygdala. *Neurosci. Lett.* **100**: 53-58.
- McDonald A.J. (1985). Morphology of peptid-containing neurons in the rat basolateral amygdaloid nucleus. *Brain Res.* **338**: 186-191.
- McEvoy T.G., Robinson J.J. und Sinclair D. (2001). Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction* **122**: 507-518.
- McGaugh J.L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci.* **25**: 456.
- McIlwain K.L., Merriweather M.Y., Yuva-Paylor L.A. und Paylor R. (2001). The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol. Behav.* **73**: 705-717.

- McIntyre C.K., Power A.E., Roozendaal B. und McGaugh J.L. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **985**: 273-293.
- McIntyre C.K., Steward O. und McGaugh J.L. (2001). Distribution of immediate early gene *Arc* mRNA in the rat brain following inhibitory avoidance training. *Neurosci. Abstr.* **27**: 84.2.
- McKernan M.G. und Shinnick-Gallagher P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vivo. *Nature* **390**: 607-611.
- McLaren A. und Michie D. (1956). Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. I. Factors affecting the implantation and survival of native and transferred eggs. *J. Exp. Biol.* **33**: 394-416.
- Meaney M.J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 1161-1192.
- Meaney M.J., Dioro J., Widdowson J., La Plante P., Caldji C., Seckl J.R. und Plotsky P.M. (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Develop. Neurosci.* **18**: 49-72.
- Meek L.R., Burda K.M. und Paster E. (2000). Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. *Physiol. Behav.* **71**: 543-549.
- Meerlo P., Horvath K.M., Nagy G.M., Bohus B. und Koolhaas J.M. (1999). The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J. Neuroendocrinol.* **11**: 925-933.
- Meier H., Hoag W.G. und McBurney J.J. (1965). Chemical characterization of inbred strain mouse milk. I. Cross composition and amino analysis. *J. Nutr.* **85**: 305-309.
- Meloni E.G. und Davis M. (1998). The dorsal cochlear nucleus contributes to a high intensity component of the acoustic startle reflex in rats. *Hear. Res.* **119**: 69-80.
- Michel M.C., Beck-Sickinger A., Cox H., Doods H.N., Herzog H., Larhammar D., Quirion R. und Westfall XVI T. (1998). International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol. Rev.* **50**: 143-150.
- Miserendino M.J.D., Sananes C.B., Melia K.R. und Davis M. (1990). Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* **345**: 716-718.
- Misslin R. (2003). The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. *Neurophysiol. Clin.* **33**: 55-66.
- Mitchell M.H., Swanson R.J. und Oehninger S. (2002). In vivo effect of leukemia inhibitory factor (LIF) and an anti-LIF polyclonal antibody on murine embryo and fetal development following exposure at the time of transcervical transfer. *Biol. Reprod.* **67**: 460-464.
- Mobraaten L.E. (1986). Mouse embryo cryobanking. *J. in Vitro Fertil. Emb. Transfer* **3**: 28-32.
- Montgomery K.C. (1955). The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **48**: 254-260.
- Moore C.L. (1995). Maternal contributions to mammalian reproductive development and the divergence of males and females. *Adv. Study Behav.* **24**: 47-118.
- Moore C.L. und Power K.L. (1986). Prenatal stress affects mother-infant interaction in Norway rats. *Dev. Psychobiol.* **19**: 235-245.
- Moore R.W., Eisen E.J. und Ulberg L.C. (1970). Prenatal and postnatal maternal influences on growth in mice selected for body weight. *Genetics* **64**: 59-68.
- Morell J.M. (1999). Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice. *Lab. Anim.* **33**: 201-206.
- Morita Y., Tsutsumi O. und Taketani Y. (1994). In vitro treatment of embryos with epidermal growth factor improves viability and increases the implantation rate of blastocysts transferred to recipient mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **171**: 406.
- Morys J., Berdel B., Kowianski P., Majak K., Tarnawski M. und Wisniewski H.M. (1999). Relationship of calcium-binding protein containing neurons and projection neurons in the rat basolateral amygdala. *Neurosci. Lett.* **259**: 91-94.
- Nagy A., Gerstenstein M., Vintersten K. und Behringer R. (2003). *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*, Inglis J. (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Nakayoma T., Goto Y., Kanzaki H., Takabatake K., Himeno T., Noda Y. und Mori T. (1995). The use of intra-uterine embryo transfer for increasing the pregnancy rate. *Hum. Reprod.* **10**: 1833-1836.
- Niehoff D.L. und Kuhar M.J. (1983). Benzodiazepine receptors: localization in rat amygdala. *J. Neurosci.* **3**: 2091-2097.
- Niemann H. und Wrenzycki C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* **53**: 21-34.
- Nosten M. (1989). Early development in mice. VI. Additive and interactive effects of offspring genotype and maternal environments. *Physiol. Behav.* **45**: 955-961.
- Nosten M. und Roubertoux P. (1988). Uterine and cytoplasmic effects on pup eyelid opening in two inbred strains of mice. *Physiol. Behav.* **43**: 167-171.

- Oberto A., Panzica G.C., Altruda F. und Eva C. (2001). GABAergic and NPY-Y1 network in the medial amygdala: a neuroanatomical basis for their functional interaction. *Neuropharmacology* **41**: 639-642.
- Oberto A., Panzica G.C., Altruda F. und Eva C. (2000). Chronic modulation of the GABA<sub>A</sub> receptor complex regulates Y<sub>1</sub> receptor gene expression in the medial amygdala of transgenic mice. *Neuropharmacology* **39**: 227-234.
- Ohta R., Matsumoto A., Nagao T. und Mizutani M. (1998). Comparative study of behavioral development between high and low shuttlebox avoidance rats. *Physiol. Behav.* **63**: 545-551.
- Okamoto A. und Matsumoto T. (1999). Production of germfree mice by embryo transfer. *Exp. Anim.* **48**: 59-62.
- Osada J. und Maeda N. (1998). Preparation of knockout mice. *Methods Mol. Biol.* **110**: 79-92.
- Owen E.H., Logue S.F., Rasmussen D.L. und Wehner J.M. (1997). Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F<sub>1</sub> hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analysis. *Neuroscience* **80**: 1087-1099.
- Packard M.G. und Teather L. (1998). Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate putamen. *Neurobiol. Learn. Mem.* **69**: 163-203.
- Palmiter R.D., Erickson J.C., Hloppeter G., Baraban S.C. und Schwartz M.W. (1998). Life without neuropeptide Y. *Recent Prog. Horm. Res.* **53**: 163-199.
- Pape H.C. und Stork O. (2003). Genes and mechanisms in the amygdala involved in the formation of fear memory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **985**: 92-105.
- Paré D. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Progr. Neurobiol.* **70**: 409-420.
- Paré D. und Collins D.R. (2000). Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. *J. Neurosci.* **20**: 2701-2710.
- Parent M.B., Avila E. und McGaugh J.L. (1995). Footshock facilitates the expression of aversively motivated memory in rats given posttraining amygdala basolateral complex lesions. *Brain Res.* **676**: 235-244.
- Park H.-J., Chae Y., Jang J., Shim I., Lee H. und Lim S. (2005). The effect of acupuncture on anxiety and neuropeptide Y expression in the basolateral amygdala of maternally separated rats. *Neurosci. Lett.* **377**: 179-184.
- Paschall G.Y., Walker D.L. und Davis M. (2001). Involvement of glutamate receptors within the amygdala in the acquisition and expression of olfactory mediated fear potentiated startle. *Soc. Neurosci. Abstr.* **27**: 1402.
- Pellow S. und File S.E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **24**: 525-529.
- Pellow S., Chopin P., File S.E. und Briley M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* **14**: 149-167.
- Pesold C. und Treit D. (1995). The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.* **671**: 213-221.
- Petrovich G.D. und Swanson L.W. (1997). Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning circuit. *Brain Res.* **763**: 247-254.
- Pitkänen A. und Kempainen S. (2002). Comparison of the distribution of calcium-binding proteins and intrinsic connectivity in the lateral nucleus of the rat, monkey, and human amygdala. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**: 369-377.
- Pitkänen A. (2000). Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton J.P. (Ed.), *The Amygdala: A Functional Analysis*, Oxford University Press, Oxford, pp. 31-116.
- Pitkänen A., Savander V. und LeDoux J.F. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* **20**: 517-523.
- Pitkänen A., Stefanacci L., Farb C.R., Go G.G., LeDoux J.E. und Amaral D.G. (1995). Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *J. Comp. Neurol.* **356**: 288-310.
- Pitkänen A. und Amaral D.G. (1994). The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *J. Neurosci.* **14**: 2200-2224.
- Pitkänen A. und Amaral D.G. (1993). Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the monkey temporal lobe: The amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* **331**: 14-36.
- Pitman R.K. (1989). Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. *Biol. Psychiatry* **26**: 221-223.
- Plagge A., Isles A.R., Gordon E., Humby T., Dean W., Giltch S., Fischer-Colbrie R., Wilkinson L.S. und Kelsey G. (2005). Imprinted *Nesp55* influences behavioral reactivity to novel environments. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 3019-3026.
- Poley W. und Rayce J.R. (1970). Genotype maternal stimulation and factors of mouse emotionality. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **71**: 246-250.
- Poltyrev T., Keshet G.-I., Kay G. und Weinstock M. (1996). Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Dev. Psychobiol.* **29**: 453-462.
- Pomp D., Cowley D.E., Eisen E.J., Atchley W.R. und Hawkins-Brown D. (1989). Donor and recipient genotype and heterosis effects on survival and prenatal growth of transferred mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* **86**: 493-500.

- Power A.E. und McGaugh J.L. (2002). Phthalic acid amygdalopetal lesion of the nucleus basalis magnocellularis induces reversible memory deficits in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* **77**: 372-388.
- Prado de Carvalho L., Grecksch G., Chapouthier G. und Rossier J. (1983). Anxiogenic and non-anxiogenic benzodiazepine antagonists. *Nature* **301**: 64-66.
- Priestnall R. (1973). The effects of litter size and post-weaning isolation or grouping on adult emotionality in C3H mice. *Dev. Psychobiol.* **6**: 217-224.
- Prut L. und Belzung C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* **463**: 3-33.
- Ragueneau S. (1987). Early development in mice. IV. Quantity and gross composition of milk in five inbred strains. *Physiol. Behav.* **40**: 431-435.
- Rall W.F., Schmidt P.M., Lin X., Brown S.S., Ward A.C. und Hansen C.T. (2000). Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models. *ILAR J.* **41**: 221-227.
- Ramos A. und Mormède P. (1998). Stress and emotionality : a multidimensional und genetic approach. *Neurosci. Behav. Rev.* **22**: 33-57.
- Randall C.L. und Lester D. (1975). Alcohol selection by DBA and C57BL mice arising from ova transfers. *Nature* **255**: 147-148.
- Reading A.J. (1966). Effect of maternal environment on the behavior of inbred mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **62**: 437-440.
- Redrobe J.P., Dumont Y., St.-Pierre J.A. und Quirion R. (1999). Multiple receptors for neuropeptide Y in the hippocampus: putative roles in seizures and cognition. *Brain Res.* **848**: 153-166.
- Reetz I.C., Wullenweber-Schmidt M., Kraft V. und Hedrich H.-J. (1988). Rederivation of inbred strains of mice by means of embryo transfer. *Lab. Anim. Sci.* **38**: 696-701.
- Ressler R.H. (1962). Parental handling in two strains of mice reared by foster parents. *Science* **137**: 129-130.
- Rex A., Sondern U., Voigt J.P., Franck S. und Fink H. (1996). Strain-differences in fear-motivated behavior of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**: 107-111.
- Robinson G.E. (2004). Beyond nature and nurture. *Science* **304**: 397-399.
- Rodgers R.J. (1997). Animal models of "anxiety": where next? *Behav. Pharmacol.* **8**: 477-496.
- Rodgers R.J. und Dalvi A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**: 801-810.
- Rodgers R.J. und Johnson N.T. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **52**: 297-303.
- Rodgers R.J., Cole J.C., Aboualfa K. und Stephenson L.H. (1995). Ethopharmacological analysis of the effects of putative "anxiogenic" agents in the mouse elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **52**: 805-813.
- Rodgers R.J. und Cole J.C. (1993). Influence of social isolation, gender, strain und prior novelty on plus-maze behavior in mice. *Physiol. Behav.* **54**: 729-736.
- Rodgers R.J., Lee C. und Shepherd J.K. (1992). Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen und prior maze experience. *Psychopharmacology* **106**: 102-110.
- Roesler R., Roozendaal B. und McGaugh J.L. (2002). Basolateral amygdala lesions block the memory enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. *Eur. J. Neurosci.* **15**: 905-910.
- Rogan M.T., Staubli U.V. und LeDoux J.E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* **390**: 604-607.
- Rogan M.T. und LeDoux J.E. (1996). Emotion: Systems, cells, synaptic plasticity. *Cell* **85**: 469-475.
- Romanski L.M., LeDoux J.E., Clugnet M.C. und Bordi F. (1993). Somatosensory und auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav. Neurosci.* **107**: 444-450.
- Romanski L.M. und LeDoux J.E. (1993). Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical und corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb. Cortex* **3**: 515-532.
- Romanski L.M. und LeDoux J.E. (1992). Equipotentiality of thalamo-amygdala und thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J. Neurosci.* **12**: 4501-4509.
- Romeo R.D., Mueller A., Sisti H.M., Ogawa S., McEwen B.S. und Brake W.G. (2003). Anxiety und fear behaviors in adult male und female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm. Behav.* **43**: 561-567.
- Roozendaal B., Sapolsky R.M. und McGaugh J.L. (1998). Basolateral amygdala lesions block the disruptive effects of long-term adrenalectomy on spatial memory. *Neuroscience* **84**: 453-465.
- Roozendaal B., Portillo-Marquez G. und McGaugh J.L. (1996). Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning. *Behav. Neurosci.* **110**: 1074-1083.
- Roozendaal B. und McGaugh J.L. (1996). The memory-modulating effects of glucocorticoids depend on an intact stria terminalis. *Brain Res.* **709**: 243-250.
- Roozendaal B., Koolhaas J.M. und Bohus B. (1991). Central amygdala lesions affect behavioral und autonomic balance during stress in rats. *Physiol. Behav.* **50**: 777-781.

- Rosen J.B., Hitchcock J.M., Sananes C.B., Miserendino M.J.D. und Davis M. (1991). A direct projection from the central nucleus of the amygdala to the acoustic startle pathway: anterograde and retrograde tracing studies. *Behav. Neurosci.* **105**: 817-825.
- Rossiter M.C. (1996). Incidence and consequences of inherited environmental effects. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**: 451-476.
- Rotzinger S. und Vaccarino F.J. (2003). Cholecystokinin receptor subtypes: role in the modulation of anxiety-related and reward-related behaviours in animal models. *J. Psychiatry Neurosci.* **28**: 171-181.
- Roubertoux P.L., Nosten-Bertrand M. und Carlier M. (1990). Additive and interactive effects of genotype and maternal environment. *Adv. Study Behav.* **19**: 205-247.
- Roudebush W.E., Massey J.B., Kort H.I., Elsner C.W., Toledo A.A., Mitchell-Leef D. und Shapiro D.B. (2004). Exposure of preimplantation embryos to platelet-activating factor increases birth rate. *J. Assist. Reprod. Genet.* **21**: 297-300.
- Roudebush W.E. und Duralia D.R. (1996). Superovulation, fertilization, and in vitro embryo development in BALB/cByJ, BALB/cJ, B6D2F1/J, and CFW mouse strains. *Lab. Anim. Sci.* **46**: 239-240.
- Rudolph U., Crestani F. und Mohler M. (2001). GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**: 188-194.
- Rudy J.W., Huff N.C. und Matus-Amat P. (2004). Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **28**: 675-685.
- Sah P., Faber E.S.L., Lopez de Armentia M. und Power J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol. Rev.* **83**: 803-834.
- Sajdyk T.J., Schober D.A. und Gehlert D.R. (2002). Neuropeptide Y receptor subtypes in the basolateral nucleus of the amygdala modulate anxiogenic responses in rats. *Neuropharmacology* **43**: 1165-1172.
- Sajdyk T.J., Vandergriff M.G. und Gehlert D.R. (1999). Amygdalar neuropeptide Y Y1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test. *Eur. J. Pharmacol.* **368**: 143-147.
- Sajdyk T.J. und Shekhar A. (1997). Excitatory amino acid receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor blockade in the basolateral amygdala of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**: 969-977.
- Salinas J.A., Introini-Collison I.B., Dalmaz C. und McGaugh J.L. (1997). Posttraining intraamygdala infusions of oxotremorine and propranolol modulate storage of memory for reductions in reward magnitude. *Neurobiol. Learn. Mem.* **68**: 51-59.
- Sananes C.B. und Davis M. (1992). N-methyl-D-aspartate lesions of the lateral und basolateral nuclei of the amygdala block fear-potentiated startle and shock sensitization of startle. *Behav. Neurosci.* **106**: 72-80.
- Sanders S.K. und Shekhar A. (1995a). Regulation of anxiety by GABA<sub>A</sub> receptors in the rat amygdala. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **52**: 701-706.
- Sanders S.K. und Shekhar A. (1995b). Anxiolytic effects of chlordiazepoxide blocked by injections of GABA<sub>A</sub> and benzodiazepine receptor antagonists in the region of the anterior basolateral amygdala of rats. *Biol. Psychiatry* **37**: 473-476.
- Santarelli L., Gobbi G., Debs P.C., Sibille E.L., Blier P., Hen R. und Heath M.J.S. (2001). Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 1912-1917.
- Savander V., Miettinen R., LeDoux J.E. und Pitkänen A. (1997). Lateral nucleus of the rat amygdala is reciprocally connected with basal and accessory basal nuclei: a light and electron microscopy study. *Neuroscience* **77**: 767-781.
- Schafe G.E., Atkins C.M., Swank M.W., Bauer E.P., Sweatt J.D. und LeDoux J.E. (2000). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J. Neurosci.* **20**: 8177-8187.
- Schafe G.E. und LeDoux J.E. (2000). Memory consolidation of pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J. Neurosci.* **20**: RC96.
- Schafe G.E., Nadel N.V., Sullivan G.M., Harris A. und LeDoux J.E. (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP-kinase. *Learn. Mem.* **6**: 97-110.
- Schmidt M., Oitzl M.S., Levine S. und de Kloet E.R. (2002). The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **139**: 39-49.
- Schmitt U., Luddens H. und Hiemke C. (2000). Behavioral effects of GABA(A) receptor stimulation and GABA-transporter inhibition. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **65**: 351-356.
- Schreurs J., Seelig T. und Schulman H. (1986). Beta2-adrenergic receptors on peripheral nerves. *J. Neurochem.* **46**: 294-296.
- Schwaller B., Meyer M. und Schiffmann S. (2002). New functions for old proteins: The role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *The Cerebellum* **1**: 241-258.
- Schwegler H., Boldyreva M., Linke R., Wu J., Zilles K. und Crusio W.E. (1996). Genetic variation in the morphology of the septo-hippocampal cholinergic and GABAergic systems in mice: II. Morpho-behavioral correlations. *Hippocampus* **6**: 535-545.

- Shekhar A., Sajdyk T.J., Gehlert D.R. und Rainnie D.G. (2003). The amygdala, panic disorder, and cardiovascular responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **985**: 308-325.
- Shi C. und Davis M. (1999). Pain pathways in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: lesion studies. *J. Neurosci.* **19**: 420-430.
- Shi C.-J. und Cassell M.D. (1998a). Cortical, thalamic and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *J. Comp. Neurol.* **399**: 440-468.
- Shi C.-J. und Cassell M.D. (1998b). Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the posterior parietal insular cortex. *J. Comp. Neurol.* **399**: 469-491.
- Shi C.-J. und Cassell M.D. (1997). Cortical, thalamic, and amygdaloid projections of rat temporal cortex. *J. Comp. Neurol.* **381**: 1-23.
- Shi C.-J. und Davis M. (1997). Anatomical tracing and lesion studies of pain pathways involved in fear conditioning measured with fear potentiated startle. *Soc. Neurosci. Abstr.* **23**: 1612.
- Sieghart W. (2000). Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**: 411-413.
- Simmel E.C. und Bagwell M. (1983). Genetics of exploratory behavior and activity. In: Fuller J.L. und Simmel E.C. (Eds.). *Behavior genetics: principles and applications*. Hillsdale, NY, Lawrence Erlbaum Associates. pp. 89-115.
- Sinclair K.D., Young L.E., Wilmot J. und McEvoy T.G. (2000). In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum. Reprod.* **15**: 68-86.
- Smith Y., Paré J.-F. und Paré D. (2000). Differential innervation of parvalbumin-immunoreactive interneurons of the basolateral amygdaloid complex by cortical and intrinsic inputs. *J. Comp. Neurol.* **416**: 496-508.
- Smith Y., Paré J.-F. und Paré D. (1998). Cat intraamygdaloid inhibitory network: Ultrastructural organization of parvalbumin-immunoreactive elements. *J. Comp. Neurol.* **391**: 164-179.
- Sorvari H., Miettinen R., Soininen H. und Pitkänen A. (1996). Parvalbumin-immunoreactive neurons make inhibitory synapses on pyramidal cells in the human amygdala: a light and electron microscopic study. *Neurosci. Lett.* **217**: 93-96.
- Sorvari H., Soininen H., Paljärvi L., Karkola K. und Pitkänen A. (1995). Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* **360**: 185-212.
- Southwick C.H. (1968). Effect of maternal environment on aggressive behavior of inbred mice. *Commun. Behav. Biol.* **1**: 129-132.
- Spearow J.L. und Barkley M. (1999). Genetic control of hormone-induced ovulation rate in mice. *Biol. Reprod.* **61**: 851-856.
- Spearow J.L., Nutson P.A., Mailliard W.S., Porter M. und Barkley M. (1999). Mapping genes that control hormone-induced ovulation rate in mice. *Biol. Reprod.* **61**: 857-872.
- Stanek L., Walker D.L. und Davis M. (2000). Amygdala infusion of LY354740, a group II metabotropic receptor agonist, blocks fear-potentiated startle in rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* **26**: 2020.
- Sternberg W.F. und Ridgway C.G. (2003). Effects of gestational stress and neonatal handling on pain, analgesia, and stress behavior of adult mice. *Physiol. Behav.* **78**: 375-383.
- Stork O., Stork S., Pape H.-C. und Obata K. (2001). Identification of genes expressed in the amygdala during formation of fear memory. *Learn. Mem.* **8**: 209-219.
- Swanson L.W. (2003). The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **985**: 174-184.
- Swanson L.W. und Petrovich G.D. (1998). What is the amygdala? *TINS* **21**: 323-331.
- Swanson L.W. (1992). *Brain maps: structure of the rat brain*, Elsevier, New York.
- Szoltys M., Galas J., Jablonka A. und Tabarowski Z. (1994). Some morphological and hormonal aspects of ovulation and superovulation in the rat. *J. Endocrinol.* **141**: 91-100.
- Tallman J.F. und Gallager D.W. (1985). The GABAergic system: A locus of benzodiazepine action. *Annu. Rev. Neurosci.* **8**: 21-44.
- Tang A. (2001). Neonatal exposure to novel environment enhances hippocampal-dependent memory. *Learn. Mem.* **8**: 257-264.
- Teixeira R.M., Santos A.R.S., Ribeiro S.J., Calixto J.B., Rae G.A. und DeLima T.C.M. (1996). Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **311**: 7-14.
- Thorsell A., Carlsson K., Ekman R. und Heilig M. (1999). Behavioral and endocrine adaptation and up-regulation of NPY expression in rat amygdala following repeated restraint stress. *Neuroreport* **10**: 3003-3007.
- Thorsell A., Svensson P., Wiklund L., Sommer W., Ekman R. und Heilig M. (1998). Suppressed neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat amygdala following restraint stress. *Regul. Pept.* **75-76**: 247-254.
- Treit D., Menard J. und Royan C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **44**: 463-469.
- Trullas R. und Skolnick P. (1993). Differences in fear-motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology* **111**: 323-331.

- Umewaza M., Kogishi K., Tajo H., Yoshimura S., Serin N., Takeda T. und Hosokawa M. (1999). High-linoleate and high-alpha-linoleate diets affect learning ability and natural behaviour in SMAR1 mice. *J. Nutr.* **129**: 431-437.
- Vallée M., Mayo W., Dellu F., Le Moal M., Simon H. und Maccari S. (1997). Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.* **17**: 2626-2636.
- Van Abeelen J.H.F. (1980). Direct genetic and maternal influences on behavior and growth in two inbred mouse strains. *Behav. Genet.* **10**: 545-551.
- Van Blerkom J. und Davis P. (2001). Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum. Reprod.* **16**: 757-764.
- Van Bockstaele E.J., Peoples J. und Telegan P. (1999). Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J. Comp. Neurol.* **412**: 410-428.
- Van der Auwera I. und D' Hooghe T. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum. Reprod.* **16**: 1237-1243.
- Van der Meer M., Baumans V., Olivier B. und van Zutphen B.L. (2001). Impact of transgenic procedures on behavioural and physiological responses in postweaning mice. *Physiol. Behav.* **73**: 133-143.
- Van der Meer M., Costa P., Baumans V., Olivier B. und van Zutphen L.F. (1999). Welfare assesment of transgenic animals: behavioural responses and morphological development of newborn mice. *ATLA, Altern. Lab. Animals* **27**: 857-868.
- Van Gaalen M.M., Stenzel-Poore M.P., Holsboer F. und Steckler T. (2002). Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. *Eur. J. Neurosci.* **15**: 2007-2015.
- Van Gaalen M.M. und Steckler T. (2000). Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behav. Brain Res.* **115**: 95-106.
- Van Keuren M.L. und Saunders T.L. (2004). Rederivation of transgenic and gene-targeted mice by embryo transfer. *Transgenic Res.* **13**: 363-371.
- Vezzani A., Sperk G. und Colmers W.F. (1999). Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation. *Trends Neurosci.* **22**: 25-30.
- Wahlsten D., Metten P., Phillips T.J., Boehm II S.L., Burkhart-Kasch S., Dorow J., Doerksen S., Downing C., Fogarty J., Rodd-Henricks K., Hen R., McKinnon C., Merrill C.M., Nolte C., Schalomon M., Schlumbohm J.P., Sibert J.R., Wenger C.D., Dudek B.C. und Crabbe J.C. (2003). Different data from different labs: Lessons from studies on gene-environment interaction. *J. Neurobiol.* **54**: 283-311.
- Wahlsten D. (1990). Insensitivity of the analysis of variance to heredity-environment interaction. *Behav. Brain Sci.* **13**: 109-161.
- Wainwright P.E. (2001). The role of nutritional factors in behavioural development in laboratory mice. *Behav. Brain Res.* **125**: 75-80.
- Wainwright P.E. (1992). Do essential fatty acids play a role in brain and behavioral development? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **16**: 193-205.
- Walker D.L., Toufexis D.J. und Davis M. (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* **463**: 199-216.
- Walker D.L. und Davis M. (2002). The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**: 379-392.
- Walker S.K., Hartwich K.M. und Seamark R.F. (1996). The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* **45**: 111-120.
- Ward G.R. und Wainwright P.E. (1988). Reduction in maternal food and water intake account for prenatal stress effects on neurobehavioral development in B6D2F2 mice. *Physiol. Behav.* **44**: 781-786.
- Ward R. (1980). Some effects of strain differences in the maternal behavior of inbred mice. *Dev. Psychobiol.* **13**: 181-190.
- Weaver I.C., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M. und Meaney M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* **7**: 847-854.
- Weaver I.C., Szyf M. und Meaney M.J. (2002). From maternal care to gene expression: DNA methylation and the maternal programming of stress responses. *Endocr. Res.* **28**: 699.
- Weil-Malherbe H., Axelrod J. und Tomchick R. (1959). Blood-brain barrier for adrenaline. *Science* **129**: 1226-1228.
- Weinstock M. (1997). Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**: 1-10.
- Weller A., Leguisamo A.C., Towns L., Ramboz S., Bagliella E., Hofer M., Hen R. und Brunner D. (2003). Maternal effects in infant and adult phenotypes of 5HT1A and 5HT1B receptor knockout mice. *Dev. Psychobiol.* **42**: 194-205.
- Wettstein J.G., Broqua P., Rocher M.N. und Junien J.L. (1994). Attenuation of fear-potentiated startle by neuropeptide Y receptor agonists. *Neuropeptides* **26**: 16-17.

- Whittaker E., Vereker E. und Lynch M.A. (1999). Neuropeptide Y inhibits glutamate release and long term potentiation in the rat dentate gyrus. *Brain Res.* **827**: 229-233.
- Wigger A., Loerscher P., Weissenbacher P., Holsboer F. und Landgraf R. (2001). Cross-fostering and cross-breeding of HAB and LAB rats: A genetic rat model of anxiety. *Behav. Genet.* **31**: 371-382.
- Wigger A. und Neumann I.D. (1999). Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol. Behav.* **66**: 293-302.
- Wolak M.L., De Joseph M.R., Cator A.D., Mokashi A.S., Brownfield M.S. und Urban J.H. (2003). Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in the rat brain by using immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* **464**: 285-311.
- Wolfer D.P., Crusio W.E. und Lipp H.-P. (2002). Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *TINS* **25**: 336-340.
- Yadin E., Thomas E., Strickland C.E. und Grishkat H.L. (1991). Anxiolytic effects of benzodiazepines in amygdala-lesioned rats. *Psychopharmacology (Berlin)* **103**: 473-479.
- Yamazaki K., Beauchamp G.K., Curran M., Bard J. und Boyse E.A. (2000). Parent-progeny recognition as a function of MHC odortype identity. *PNAS* **97**: 10500-10502.
- Yannielli P.C. und Harrington M.E. (2001). Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides* **22**: 547-556.
- Yasui Y., Saper C. und Cechetto D. (1989). Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the visceral sensory cortex, thalamus, and related pathways in the rat. *J. Comp. Neurol.* **290**: 487-501.
- Yeomans J.S. und Frankland P.W. (1996). The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res. Rev.* **21**: 301-314.
- Yilmazer-Hanke D.M., Wigger A., Linke R., Landgraf R. und Schwegler H. (2004a). Two Wistar rat lines selectively bred for anxiety-related behavior show opposite reactions in elevated plus maze and fear-sensitized acoustic startle tests. *Behav. Genet.* **34**: 309-317.
- Yilmazer-Hanke D.M., Hantsch M., Hanke J., Schulz C., Faber-Zuschratter H. und Schwegler H. (2004b). Neonatal thyroxine treatment: changes in the number of corticotropin-releasing-factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY) containing neurons and density of tyrosine hydroxylase positive fibers (TH) in the amygdala correlate with anxiety-related behavior of Wistar rats. *Neuroscience* **124**: 283-297.
- Yilmazer-Hanke D.M., Roskoden T., Zilles K. und Schwegler H. (2003). Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABA<sub>A</sub>, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. *Behav. Brain Res.* **145**: 145-159.
- Yilmazer-Hanke D.M., Faber-Zuschratter H., Linke R. und Schwegler H. (2002). Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low-avoidance rats. *Eur. J. Neurosci.* **15**: 1206-1218.
- Yoder J.A., Walsh C.P. und Bestor T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13**: 335-340.
- Young B.J. und Leaton R.N. (1996). Amygdala central nucleus lesions attenuate acoustic startle stimulus-evoked heart rate changes in rats. *Behav. Neurosci.* **110**: 228-237.
- Zaharia M.-D., Kulczycki J., Shanks N., Meaney M.-J. und Anisman H. (1996). The effects of early postnatal stimulation on Morris water-maze acquisition in adult mice: Genetic and maternal factors. *Psychopharmacology (Berl.)* **128**: 227-239.
- Zorumski C.F. und Isenberg K.E. (1991). Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. *Am. J. Psychiatry* **148**: 162-173.

## F. Anhang

### 1. Abkürzungen

ACTH	=	Adrenocorticotropes Hormon
AMPA	=	$\pm$ - $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
ANOVA	=	Varianzanalyse
APV	=	$\pm$ -2-Amino-5-phosphonovalonsäure
ASR	=	akustische Schreckreaktion
BDNF	=	Brain Derived Neurotrophic Factor
BL	=	basolateraler Nucleus der Amygdala
BLA	=	basolateraler Komplex der Amygdala
BM	=	basomedialer Nucleus der Amygdala
BNST	=	Bettkern der Stria terminalis
BZ	=	Benzodiazepin
CCK	=	Cholecystokinin
CeA	=	zentraler Nucleus der Amygdala
CeAc	=	zentraler Nucleus der Amygdala, kapsulärer Anteil
CeAl	=	zentraler Nucleus der Amygdala, lateraler Anteil
CeAm	=	zentraler Nucleus der Amygdala, medialer Anteil
CoA	=	kortikale Nuclei der Amygdala
CRF	=	Corticotropin Releasing Factor
CS	=	konditionierter Stimulus
DMV	=	Nucleus dorsalis nervi vagi
EGF	=	Epidermal Growth Factor
EPM	=	Elevated Plus-Maze
GABA	=	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAD	=	Glutamat-Decarboxylase
5-HT	=	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
INS	=	Insula
L	=	lateraler Nucleus der Amygdala
LC	=	Locus coeruleus
LH	=	lateraler Hypothalamus
LIF	=	Leukemia Inhibitory Factor

---

LTP	=	Langzeitpotenzierung
MeA	=	medialer Nucleus der Amygdala
MGM	=	mediale Anteile des medial geniculate Nucleus des Thalamus
MGV	=	ventrale Anteile des medial geniculate Nucleus des Thalamus
mtDNA	=	mitochondriale DNA
NMDA	=	N-methyl-D-aspartat
NPY	=	Neuropeptid Y
NT	=	Neurotensin
NTS	=	Nucleus tractus solitarii
OF	=	Open Field
PAF	=	Platelet Activating Factor
PAG	=	zentrales Höhlengrau
PARV	=	Parvalbumin
PB	=	Nucleus parabrachialis
PIN	=	Nucleus intralaminaris posterior des Thalamus
PIR	=	piriformer Kortex
PnC	=	Nucleus reticularis pontis caudalis
PRh	=	perirhinaler Kortex
PVN	=	Nucleus paraventralis des Hypothalamus
QTL	=	Quantitative trait loci
S.E.M.	=	Standardfehler des Mittelwertes
SP	=	Substanz P
TE	=	auditorischer Kortex
US	=	unkonditionierter Stimulus
VMH	=	Nucleus ventromedialis hypothalami
ZNS	=	Zentralnervensystem

## **2. Tabellen**

Signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ ) wurden fett hervorgehoben, p-Werte nahe der Signifikanzgrenze ( $p = 0,05$  bis  $p < 0,1$ ) wurden kursiv dargestellt.

n.s. = nicht signifikant ( $p \geq 0,1$ )

### *Legende Tabellen:*

#### a) Motilitätsbox

LAUF 0005	=	Laufzeit in den ersten 5 Minuten
LAUF 0510	=	Laufzeit in den zweiten 5 Minuten
LAUF 0010	=	Laufzeit in den gesamten 10 Minuten
WEG 0005	=	zurückgelegter Weg in den ersten 5 Minuten
WEG 0510	=	zurückgelegter Weg in den zweiten 5 Minuten
WEG 0010	=	zurückgelegter Weg in den gesamten 10 Minuten
AUFRZ 0005	=	mit Aufrichtungen verbrachte Zeit in den ersten 5 Minuten
AUFRZ 0510	=	mit Aufrichtungen verbrachte Zeit in den zweiten 5 Minuten
AUFRZ 0010	=	mit Aufrichtungen verbrachte Zeit in den gesamten 10 Minuten
ZAUF 0005	=	Anzahl der Aufrichtungen in den ersten 5 Minuten
ZAUF 0510	=	Anzahl der Aufrichtungen in den zweiten 5 Minuten
ZAUF 0010	=	Anzahl der Aufrichtungen in den gesamten 10 Minuten
MITTE 0005	=	im Zentrum der Box verbrachte Zeit in den ersten 5 Minuten
MITTE 0510	=	im Zentrum der Box verbrachte Zeit in den zweiten 5 Minuten
MITTE 0010	=	im Zentrum der Box verbrachte Zeit in den gesamten 10 Minuten

#### b) Elevated Plus-Maze

ZAHL OA	=	Anzahl der Eintritte in die offenen Arme
ZAHL GA	=	Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme
ZAHL ZENT	=	Anzahl der Eintritte in die zentrale Plattform
ZEIT OA	=	verbrachte Zeit in den offenen Armen
ZEIT GA	=	verbrachte Zeit in den geschlossenen Armen
ZEIT ZENT	=	verbrachte Zeit in der zentralen Plattform
OA/OA+GA	=	verbrachte Zeit in den offenen Armen / (verbrachte Zeit in den offenen Armen + verbrachte Zeit in den geschlossenen Armen)
OA/Ges.Zeit	=	relative verbrachte Zeit in den offenen Armen

#### c) Furcht-sensitivierte akustische Schreckreaktion

B5 - B4	=	„sofortige“ Sensitivierung
(B567) - (B34)	=	„gesamte“ Sensitivierung

#### d) Transfergruppen

CC	=	C3H in C3H
DC	=	DBA in C3H
NC	=	NMRI in C3H
DD	=	DBA in DBA
CD	=	C3H in DBA
ND	=	NMRI in DBA
NN	=	NMRI in NMRI
CN	=	C3H in NMRI
DN	=	DBA in NMRI

Variable	Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte			ANOVA		Tukey-Test		
	DBA-Kontrolle (n = 17)	C3H-Kontrolle (n = 18)	NMRI-Kontrolle (n = 16)	F- Werte	p-Werte	C-D	C-N	D-N
Motilitäts- box								
LAUF 0005	165,41 ± 4,85	135,72 ± 7,85	202,00 ± 5,09	28,39	< 0,001	+	+	+
LAUF 0510	160,29 ± 4,32	137,67 ± 7,46	172,88 ± 4,75	9,52	< 0,001	+	+	-
LAUF 0010	325,71 ± 7,81	273,39 ± 13,78	374,88 ± 9,20	22,10	< 0,001	+	+	+
WEG 0005	21,35 ± 1,13	12,22 ± 1,01	26,04 ± 1,46	34,68	< 0,001	+	+	+
WEG 0510	22,56 ± 0,71	12,79 ± 1,00	20,63 ± 1,00	33,10	< 0,001	+	+	-
WEG 0010	43,92 ± 1,47	25,02 ± 1,82	46,68 ± 2,32	40,16	< 0,001	+	+	-
AUFRZ 0005	25,18 ± 2,07	8,39 ± 1,77	39,25 ± 4,00	32,70	< 0,001	+	+	+
AUFRZ 0510	31,41 ± 2,34	15,28 ± 2,84	57,94 ± 3,80	50,43	< 0,001	+	+	+
AUFRZ 0010	56,59 ± 3,16	23,67 ± 4,27	97,19 ± 7,39	51,40	< 0,001	+	+	+
ZAUF 0005	38,06 ± 2,66	14,94 ± 3,51	64,31 ± 5,43	38,77	< 0,001	+	+	+
ZAUF 0510	52,71 ± 2,91	21,39 ± 4,79	75,38 ± 5,08	38,75	< 0,001	+	+	+
ZAUF 0010	90,76 ± 4,58	36,33 ± 7,95	139,69 ± 9,89	44,94	< 0,001	+	+	+
MITTE 0005	17,53 ± 1,92	49,72 ± 14,34	33,25 ± 4,08	3,20	< 0,05	+	-	-
MITTE 0510	20,29 ± 2,07	17,22 ± 7,08	19,06 ± 1,56	0,12	n.s.			
MITTE 0010	37,82 ± 2,67	66,94 ± 19,99	52,31 ± 4,48	1,38	n.s.			
Elevated Plus-Maze								
ZAHL OA	1,24 ± 0,32	0,64 ± 0,27	2,88 ± 0,43	10,76	< 0,001	-	+	+
ZAHL GA	6,76 ± 0,99	5,14 ± 0,80	14,38 ± 0,87	29,31	< 0,001	-	+	+
ZAHL ZENT	8,06 ± 1,24	5,79 ± 0,91	17,56 ± 0,99	32,97	< 0,001	-	+	+
ZEIT OA	10,53 ± 3,15	14,21 ± 5,37	25,74 ± 4,42	3,55	0,04	-	-	+
ZEIT GA	274,00 ± 5,62	251,93 ± 13,46	222,62 ± 8,48	8,17	< 0,01	-	-	+
ZEIT ZENT	15,47 ± 3,08	33,86 ± 10,25	51,63 ± 5,78	7,98	< 0,01	-	-	+
OA/OA+GA	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,11 ± 0,02	3,86	0,03	-	-	+
OA/Ges. Zeit	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,01	3,55	0,04	-	-	+
<b>Schreck- reaktion</b>								
BLOCK1	112,81 ± 19,63	1445,00 ± 132,41	1149,12 ± 142,86	39,05	< 0,001	+	-	+
BLOCK2	104,18 ± 26,11	1494,76 ± 147,81	1299,25 ± 175,67	32,67	< 0,001	+	-	+
BLOCK3	91,76 ± 22,32	1288,73 ± 120,07	1173,12 ± 160,06	33,45	< 0,001	+	-	+
BLOCK4	83,06 ± 22,50	1253,43 ± 132,97	999,18 ± 144,01	29,78	< 0,001	+	-	+
BLOCK5	334,12 ± 68,20	1336,37 ± 114,96	945,99 ± 121,00	25,54	< 0,001	+	+	+
BLOCK6	225,48 ± 46,05	1364,68 ± 113,90	1186,52 ± 157,22	29,53	< 0,001	+	-	+
BLOCK7	176,88 ± 51,65	1405,88 ± 120,26	1205,66 ± 162,51	31,20	< 0,001	+	-	+
B1+B2/2	108,49 ± 21,66	1469,88 ± 137,69	1224,18 ± 157,54	36,55	< 0,001	+	-	+
B3+B4/2	87,41 ± 21,91	1271,08 ± 123,75	1086,15 ± 148,07	33,14	< 0,001	+	-	+
B5+B6+B7/3	245,50 ± 51,08	1378,98 ± 96,50	1112,73 ± 138,28	35,70	< 0,001	+	-	+
B5 - B4	251,06 ± 61,49	112,94 ± 101,70	-53,18 ± 107,51	2,63	0,08			
(B567)-(B34)	561,67 ± 144,86	1594,78 ± 203,38	1165,88 ± 242,52	6,94	< 0,01	+	-	-

Tab.1. Verhalten der Ausgangsstämme DBA, C3H und NMRI in der Motilitätsbox, auf dem Elevated Plus-Maze und in der Furcht-sensitiven Schreckreaktion. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.) für die untersuchten Parameter der drei Verhaltenstests, sowie das Ergebnis der ANOVA und der nachfolgenden Tukey-Tests für den Vergleich der drei Stämme.

Anzahl der Freiheitsgrade  $df = 2$

C-D = Vergleich der Stämme C3H und DBA

C-N = Vergleich der Stämme C3H und NMRI

D-N = Vergleich der Stämme DBA und NMRI

Variable	Vergleich der Kontrollen mit den zugehörigen isogenen Transfers								
	NMRI			C3H			DBA		
	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte
<b>Motilitätsbox</b>									
LAUF 0005	25,6	-1,25	n.s.	33,3	0,13	n.s.	14,2	-0,60	n.s.
LAUF 0510	29,8	-1,84	0,08	30,8	-0,13	n.s.	14,3	-1,16	n.s.
LAUF 0010	26,5	-1,72	< 0,1	31,5	-0,00	n.s.	13,7	-0,98	n.s.
WEG 0005	27,1	0,74	n.s.	32,8	0,34	n.s.	17,1	-0,68	n.s.
WEG 0510	27,6	-0,13	n.s.	31,8	-0,00	n.s.	11,7	-0,86	n.s.
WEG 0010	25,4	0,42	n.s.	31,8	0,18	n.s.	12,6	-0,85	n.s.
AUFRZ 0005	25,0	1,88	0,07	28,9	2,55	<b>0,02</b>	12,5	-0,59	n.s.
AUFRZ 0510	30,8	0,91	n.s.	32,9	2,01	0,05	17,3	-1,70	n.s.
AUFRZ 0010	29,4	1,47	n.s.	33,4	2,67	<b>0,01</b>	11,9	-1,27	n.s.
ZAUFR 0005	28,9	1,91	0,07	32,3	1,56	n.s.	15,4	-0,97	n.s.
ZAUFR 0510	29,8	1,69	n.s.	32,8	1,59	n.s.	14,4	-1,24	n.s.
ZAUFR 0010	28,4	1,96	0,06	33,0	1,68	n.s.	13,9	-1,28	n.s.
MITTE 0005	20,4	-2,69	<b>0,01</b>	26,3	-1,19	n.s.	19,2	-0,45	n.s.
MITTE 0510	24,8	-0,37	n.s.	24,2	-0,52	n.s.	15,2	-0,23	n.s.
MITTE 0010	30,7	-2,13	<b>0,04</b>	24,3	-1,06	n.s.	13,4	-0,40	n.s.
Elevated Plus-Maze									
ZAHL OA	25,5	1,32	n.s.	24,6	-0,34	n.s.	9,24	0,89	n.s.
ZAHL GA	30,9	0,12	n.s.	25,7	-1,30	n.s.	11,0	0,99	n.s.
ZAHL ZENT	29,3	0,84	n.s.	24,5	-1,17	n.s.	10,6	1,01	n.s.
ZEIT OA	24,4	0,99	n.s.	19,3	0,68	n.s.	10,7	0,62	n.s.
ZEIT GA	28,9	-1,54	n.s.	26,6	-0,78	n.s.	9,75	-0,56	n.s.
ZEIT ZENT	30,8	1,30	n.s.	28,4	0,45	n.s.	10,1	0,48	n.s.
OA/OA+GA	24,2	1,09	n.s.	20,6	0,59	n.s.	9,96	0,68	n.s.
OA/Ges.Zeit	24,4	0,99	n.s.	19,3	0,68	n.s.	10,7	0,62	n.s.
<b>Akustische Schreckreaktion</b>									
BLOCK1	19,0	-4,56	< <b>0,001</b>	33,0	-0,60	n.s.	8,22	1,54	n.s.
BLOCK2	17,0	-5,25	< <b>0,001</b>	32,9	-0,83	n.s.	9,28	1,09	n.s.
BLOCK3	17,9	-5,23	< <b>0,001</b>	31,1	-0,47	n.s.	9,67	0,98	n.s.
BLOCK4	17,7	-4,83	< <b>0,01</b>	32,8	-0,54	n.s.	12,0	1,07	n.s.
BLOCK5	28,9	-1,65	n.s.	30,7	-0,48	n.s.	14,8	1,35	n.s.
BLOCK6	23,3	-3,71	< <b>0,01</b>	28,1	-0,24	n.s.	11,0	1,86	0,09
BLOCK7	20,0	-4,32	< <b>0,001</b>	28,6	-0,06	n.s.	13,9	1,62	n.s.
B1+B2/2	17,3	-5,04	< <b>0,001</b>	33,0	-0,75	n.s.	8,45	1,39	n.s.
B3+B4/2	17,7	-5,19	< <b>0,001</b>	32,2	-0,52	n.s.	10,5	1,05	n.s.
B5+B6+B7/3	24,9	-3,50	< <b>0,01</b>	26,4	-0,27	n.s.	12,9	1,72	n.s.
B5 - B4	29,0	2,99	< <b>0,01</b>	31,0	0,09	n.s.	19,5	1,24	n.s.
(B567) - (B34)	28,5	-0,35	n.s.	26,2	0,11	n.s.	17,2	1,78	0,09

Tab.2. Effekt der Transferprozedur auf die adulten Nachkommen der Stämme C3H, DBA und NMRI. Ergebnisse der t-Tests für den Vergleich der unbehandelten Kontrolltiere eines jeden Stammes mit der zugehörigen isogenen Transfergruppe.

df = Anzahl der Freiheitsgrade

Variable	Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte					
	NMRI-Kontrolle	NMRI in NMRI	C3H-Kontrolle	C3H in C3H	DBA-Kontrolle	DBA in DBA
Motilitätsbox						
LAUF 0005	202,00 ± 5,09	194,47 ± 3,22	135,72 ± 7,85	137,33 ± 9,08	165,41 ± 4,85	159,89 ± 7,86
LAUF 0510	172,88 ± 4,75	161,41 ± 4,03	137,67 ± 7,46	135,94 ± 10,41	160,29 ± 4,32	150,78 ± 6,97
LAUF 0010	374,88 ± 9,20	355,88 ± 6,16	273,39 ± 13,78	273,28 ± 18,37	325,71 ± 7,81	310,67 ± 13,30
WEG 0005	26,04 ± 1,46	27,36 ± 1,02	12,22 ± 1,01	12,76 ± 1,22	21,35 ± 1,13	20,09 ± 1,48
WEG 0510	20,63 ± 1,00	20,48 ± 0,72	12,79 ± 1,00	12,79 ± 1,31	22,56 ± 0,71	21,14 ± 1,50
WEG 0010	46,68 ± 2,32	47,84 ± 1,45	25,02 ± 1,82	25,54 ± 2,39	43,92 ± 1,47	41,23 ± 2,78
AUFRZ 0005	39,25 ± 4,00	48,06 ± 2,44	8,39 ± 1,77	16,78 ± 2,78	25,18 ± 2,07	22,56 ± 3,97
AUFRZ 0510	57,94 ± 3,80	63,12 ± 4,23	15,28 ± 2,84	24,22 ± 3,42	31,41 ± 2,34	24,89 ± 3,04
AUFRZ 0010	97,19 ± 7,39	111,18 ± 6,04	23,67 ± 4,27	41,00 ± 4,90	56,59 ± 3,16	47,44 ± 6,50
ZAUFZ 0005	64,31 ± 5,43	77,47 ± 4,26	14,94 ± 3,51	23,78 ± 4,44	38,06 ± 2,66	33,44 ± 3,93
ZAUFZ 0510	75,38 ± 5,08	86,59 ± 4,28	21,39 ± 4,79	33,33 ± 5,81	52,71 ± 2,91	45,89 ± 4,66
ZAUFZ 0010	139,69 ± 9,89	164,06 ± 7,50	36,33 ± 7,95	57,11 ± 9,46	90,76 ± 4,58	79,33 ± 7,66
MITTE 0005	33,25 ± 4,08	21,29 ± 1,76	49,72 ± 14,34	30,28 ± 7,85	17,53 ± 1,92	16,22 ± 2,20
MITTE 0510	19,06 ± 1,56	17,88 ± 2,81	17,22 ± 7,08	13,17 ± 3,33	20,29 ± 2,07	19,44 ± 3,09
MITTE 0010	52,31 ± 4,48	39,18 ± 4,22	66,94 ± 19,99	43,44 ± 9,48	37,82 ± 2,67	35,67 ± 4,67
Elevated Plus-Maze						
ZAHL OA	2,88 ± 0,43	4,00 ± 0,74	0,64 ± 0,27	0,53 ± 0,19	1,24 ± 0,32	2,00 ± 0,80
ZAHL GA	14,38 ± 0,87	14,53 ± 0,96	5,14 ± 0,80	3,82 ± 0,62	6,76 ± 0,99	8,88 ± 1,89
ZAHL ZENT	17,56 ± 0,99	18,94 ± 1,30	5,79 ± 0,91	4,47 ± 0,65	8,06 ± 1,24	10,88 ± 2,49
ZEIT OA	25,74 ± 4,42	35,00 ± 8,25	14,21 ± 5,37	25,94 ± 16,49	10,53 ± 3,15	14,88 ± 6,29
ZEIT GA	222,62 ± 8,48	200,49 ± 11,54	251,93 ± 13,46	232,71 ± 20,58	274,00 ± 5,62	266,13 ± 12,89
ZEIT ZENT	51,63 ± 5,78	62,92 ± 6,49	33,86 ± 10,25	41,35 ± 13,15	15,47 ± 3,08	19,00 ± 6,66
OA/OA+GA	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,10 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,03
OA/Ges.Zeit	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,02
Schreckreaktion						
BLOCK1	1149,12 ± 142,86	454,32 ± 53,09	1445,00 ± 132,41	1333,52 ± 131,60	112,81 ± 19,63	370,79 ± 166,57
BLOCK2	1299,25 ± 175,67	346,04 ± 45,47	1494,76 ± 147,81	1318,36 ± 151,60	104,18 ± 26,11	209,71 ± 93,23
BLOCK3	1173,12 ± 160,06	296,19 ± 49,98	1288,73 ± 120,07	1199,16 ± 150,17	91,76 ± 22,32	163,70 ± 69,79
BLOCK4	999,18 ± 144,01	272,24 ± 43,31	1253,43 ± 132,97	1149,85 ± 139,27	83,06 ± 22,50	137,58 ± 45,83
BLOCK5	945,99 ± 121,00	661,03 ± 123,35	1336,37 ± 114,96	1277,56 ± 147,36	334,12 ± 68,20	503,89 ± 105,18
BLOCK6	1186,52 ± 157,22	518,54 ± 87,53	1364,68 ± 113,90	1315,36 ± 171,66	225,48 ± 46,05	443,46 ± 107,65
BLOCK7	1205,66 ± 162,51	444,91 ± 67,38	1405,88 ± 120,26	1393,52 ± 175,61	176,88 ± 51,65	339,87 ± 86,42
B1+B2/2	1224,18 ± 157,54	400,18 ± 43,70	1469,88 ± 137,69	1325,94 ± 133,54	108,49 ± 21,66	290,25 ± 129,13
B3+B4/2	1086,15 ± 148,07	284,21 ± 44,63	1271,08 ± 123,75	1174,51 ± 140,05	87,41 ± 21,91	150,64 ± 56,34
B5+B6+B7/3	1112,73 ± 138,28	541,49 ± 86,27	1378,98 ± 96,50	1328,81 ± 160,96	245,50 ± 51,08	429,07 ± 94,03
B5 - B4	-53,18 ± 107,51	338,79 ± 101,72	112,94 ± 101,70	127,71 ± 127,23	251,06 ± 61,49	366,31 ± 69,46
(B567) - (B34)	1165,88 ± 242,52	1056,05 ± 204,97	1594,78 ± 203,38	1637,42 ± 343,18	561,67 ± 144,86	985,93 ± 189,08

Tab.3. Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.) der untersuchten Verhaltensparameter der Motilitätsbox, des Elevated Plus-Maze und der Furchtsensitivierten akustischen Schreckreaktion bei den unbehandelten Kontrolltieren der Stämme C3H, DBA und NMRI sowie den zugehörigen isogenen Transfergruppen.

Variable	Vergleich der Kontrollen					Vergleich der isogenen Transfers				
	ANOVA (df = 2)		Tukey-Test			ANOVA (df = 2)		Tukey-Test		
	F-Werte	p-Werte	C-D	C-N	D-N	F-Werte	p-Werte	CC -DD	CC -NN	DD -NN
Motilitätsbox										
LAUF 0005	28,39	< 0,001	+	+	+	18,13	< 0,001	-	+	+
LAUF 0510	9,52	< 0,001	+	+	-	2,85	0,07			
LAUF 0010	22,10	< 0,001	+	+	+	9,69	< 0,001	-	+	-
WEG 0005	34,68	< 0,001	+	+	+	42,51	< 0,001	+	+	+
WEG 0510	33,10	< 0,001	+	+	-	16,66	< 0,001	+	+	-
WEG 0010	40,16	< 0,001	+	+	-	32,25	< 0,001	+	+	-
AUFRZ 0005	32,70	< 0,001	+	+	+	36,85	< 0,001	-	+	+
AUFRZ 0510	50,43	< 0,001	+	+	+	35,10	< 0,001	-	+	+
AUFRZ 0010	51,40	< 0,001	+	+	+	48,94	< 0,001	-	+	+
ZAUFR 0005	38,77	< 0,001	+	+	+	46,06	< 0,001	-	+	+
ZAUFR 0510	38,75	< 0,001	+	+	+	31,64	< 0,001	-	+	+
ZAUFR 0010	44,94	< 0,001	+	+	+	46,43	< 0,001	-	+	+
MITTE 0005	3,20	< 0,05	+	-	-	1,41	n.s.			
MITTE 0510	0,12	n.s.				1,02	n.s.			
MITTE 0010	1,38	n.s.				0,24	n.s.			
<b>Elevated Plus-Maze</b>										
ZAHL OA	10,76	< 0,001	-	+	+	10,32	< 0,001	-	+	-
ZAHL GA	29,31	< 0,001	-	+	+	34,09	< 0,001	+	+	+
ZAHL ZENT	32,97	< 0,001	-	+	+	37,57	< 0,001	+	+	+
ZEIT OA	3,55	0,04	-	-	+	0,47	n.s.			
ZEIT GA	8,17	< 0,01	-	-	+	3,00	0,06			
ZEIT ZENT	7,98	< 0,01	-	-	+	3,54	0,04	-	-	+
OA/OA+GA	3,86	0,03	-	-	+	0,78	n.s.			
OA/Ges. Zeit	3,55	0,04	-	-	+	0,47	n.s.			
<b>Akustische Schreckreaktion</b>										
BLOCK1	39,05	< 0,001	+	-	+	21,57	< 0,001	+	+	-
BLOCK2	32,67	< 0,001	+	-	+	27,36	< 0,001	+	+	-
BLOCK3	33,45	< 0,001	+	-	+	24,75	< 0,001	+	+	-
BLOCK4	29,78	< 0,001	+	-	+	28,31	< 0,001	+	+	-
BLOCK5	25,54	< 0,001	+	+	+	8,98	< 0,001	+	+	-
BLOCK6	29,53	< 0,001	+	-	+	12,36	< 0,001	+	+	-
BLOCK7	31,20	< 0,001	+	-	+	18,80	< 0,001	+	+	-
B1+B2/2	36,55	< 0,001	+	-	+	27,60	< 0,001	+	+	-
B3+B4/2	33,14	< 0,001	+	-	+	28,27	< 0,001	+	+	-
B5+B6+B7/3	35,70	< 0,001	+	-	+	14,21	< 0,001	+	+	-
B5 - B4	2,63	0,08				1,75	n.s.			
(B567) - (B34)	6,94	< 0,01	+	-	-	1,62	n.s.			

Tab.4. Vergleich der unbehandelten Kontrolltiere und Vergleich der isogenen Transfers der Stämme C3H, DBA und NMRI in den untersuchten Parametern der Motilitätsbox, des Elevated Plus-Maze und der Furcht-sensitiven akustischen Schreckreaktion. Ergebnisse der ANOVAs mit den zugehörigen Tukey-Tests.

df = Anzahl der Freiheitsgrade

C-D = Vergleich der Stämme C3H und DBA

C-N = Vergleich der Stämme C3H und NMRI

D-N = Vergleich der Stämme DBA und NMRI

CC-DD = Vergleich der isogenen Transfers der Stämme C3H und DBA

CC-NN = Vergleich der isogenen Transfers der Stämme C3H und NMRI

DD-NN = Vergleich der isogenen Transfers der Stämme DBA und NMRI

Variable	Geschlecht	Donatoren	Rezipienten	Donatoren × Rezipienten	Donatoren × Geschlecht	Rezipienten × Geschlecht
<b>Motilitätsbox</b>	df = 1	df = 2	df = 2	df = 4	df = 2	df = 2
LAUF 0005	F = 0,04 p = n.s.	F = 66,34 <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,73 p = n.s.	<b>F = 2,65</b> <b>p = 0,04</b>	F = 1,43 p = n.s.	F = 0,84 p = n.s.
LAUF 0510	<b>F = 4,41</b> <b>p = 0,04</b>	<b>F = 19,50</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,09 p = n.s.	F = 1,75 p = n.s.	F = 1,17 p = n.s.	F = 0,12 p = n.s.
LAUF 0010	F = 1,71 p = n.s.	<b>F = 44,37</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,30 p = n.s.	<b>F = 2,42</b> <b>p = 0,05</b>	F = 1,50 p = n.s.	F = 0,41 p = n.s.
WEG 0005	F = 1,04 p = n.s.	<b>F = 96,57</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 3,12</b> <b>p &lt; 0,05</b>	<b>F = 2,64</b> <b>p = 0,04</b>	F = 1,03 p = n.s.	F = 0,33 p = n.s.
WEG 0510	<b>F = 2,96</b> <b>p = 0,09</b>	<b>F = 62,17</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,84 p = n.s.	F = 1,50 p = n.s.	F = 1,04 p = n.s.	F = 0,17 p = n.s.
WEG 0010	F = 0,10 p = n.s.	<b>F = 89,27</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 2,20 p = n.s.	<b>F = 2,40</b> <b>p = 0,05</b>	F = 1,26 p = n.s.	F = 0,24 p = n.s.
AUFRZ 0005	F = 1,02 p = n.s.	<b>F = 129,62</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 8,53</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 2,22</b> <b>p = 0,07</b>	F = 0,65 p = n.s.	F = 1,97 p = n.s.
AUFRZ 0510	F = 0,85 p = n.s.	<b>F = 102,76</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 11,12</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,55 p = n.s.	F = 1,19 p = n.s.	F = 0,55 p = n.s.
AUFRZ 0010	F = 0,01 p = n.s.	<b>F = 146,56</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 12,89</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,54 p = n.s.	F = 0,97 p = n.s.	F = 0,41 p = n.s.
ZAUFZ 0005	<b>F = 2,92</b> <b>p = 0,09</b>	<b>F = 160,48</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 7,81</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 1,81 p = n.s.	<b>F = 2,55</b> <b>p = 0,08</b>	<b>F = 3,60</b> <b>p = 0,03</b>
ZAUFZ 0510	F = 0,14 p = n.s.	<b>F = 110,89</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 7,15</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 1,20 p = n.s.	F = 2,30 p = n.s.	F = 0,26 p = n.s.
ZAUFZ 0010	F = 0,42 p = n.s.	<b>F = 159,47</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 8,95</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 1,13 p = n.s.	<b>F = 2,69</b> <b>p = 0,07</b>	F = 1,40 p = n.s.
MITTE 0005	F = 0,01 p = n.s.	<b>F = 5,87</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 0,99 p = n.s.	F = 0,77 p = n.s.	F = 0,80 p = n.s.	<b>F = 3,28</b> <b>p = 0,04</b>
MITTE 0510	F = 2,29 p = n.s.	F = 1,18 p = n.s.	F = 1,40 p = n.s.	F = 0,95 p = n.s.	F = 1,33 p = n.s.	<b>F = 3,71</b> <b>p = 0,03</b>
MITTE 0010	F = 0,41 p = n.s.	<b>F = 3,09</b> <b>p &lt; 0,05</b>	F = 1,29 p = n.s.	F = 0,93 p = n.s.	F = 1,08 p = n.s.	<b>F = 3,90</b> <b>p = 0,02</b>
<b>Elevated Plus-Maze</b>						
ZAHL OA	F = 0,22 p = n.s.	<b>F = 26,76</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,03 p = n.s.	F = 0,75 p = n.s.	F = 0,38 p = n.s.	F = 1,01 p = n.s.
ZAHL GA	<b>F = 3,58</b> <b>p = 0,06</b>	<b>F = 55,96</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,01 p = n.s.	<b>F = 3,51</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 0,17 p = n.s.	F = 0,04 p = n.s.
ZAHL ZENT	<b>F = 2,94</b> <b>p = 0,09</b>	<b>F = 61,06</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,02 p = n.s.	<b>F = 2,92</b> <b>p = 0,02</b>	F = 0,15 p = n.s.	F = 0,22 p = n.s.
ZEIT OA	F = 1,53 p = n.s.	<b>F = 2,35</b> <b>p &lt; 0,1</b>	F = 0,39 p = n.s.	F = 0,20 p = n.s.	F = 1,34 p = n.s.	F = 1,35 p = n.s.
ZEIT GA	F = 0,00 p = n.s.	<b>F = 10,91</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,13 p = n.s.	F = 1,10 p = n.s.	F = 0,27 p = n.s.	F = 0,66 p = n.s.
ZEIT ZENT	<b>F = 3,17</b> <b>p = 0,08</b>	<b>F = 16,71</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 0,01 p = n.s.	<b>F = 2,83</b> <b>p = 0,03</b>	<b>F = 2,69</b> <b>p = 0,07</b>	F = 0,38 p = n.s.
OA/OA+GA	F = 1,33 p = n.s.	<b>F = 3,48</b> <b>p = 0,03</b>	F = 0,29 p = n.s.	F = 0,16 p = n.s.	F = 0,99 p = n.s.	F = 1,30 p = n.s.
OA/Ges.Zeit	F = 1,58 p = n.s.	F = 2,22 p = n.s.	F = 0,40 p = n.s.	F = 0,20 p = n.s.	F = 1,27 p = n.s.	F = 1,35 p = n.s.

Tab. 5a. Ergebnisse der drei-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Embryo-Donatoren, Embryo-Rezipienten und Geschlecht für das Verhalten der Nachkommen der reziproken Embryo-transfers der Stämme C3H, DBA und NMRI. Parameter der Motilitätsbox und des Elevated Plus-Maze.  
df = Anzahl der Freiheitsgrade

Variable	Geschlecht	Donatoren	Rezipienten	Donatoren × Rezipienten	Donatoren × Geschlecht	Rezipienten × Geschlecht
<b>Akustische Schreckreaktion</b>	df = 1	df = 2	df = 2	df = 4	df = 2	df = 2
BLOCK1	<b>F = 8,93</b> <b>p &lt; 0,01</b>	<b>F = 82,22</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 4,15</b> <b>p = 0,02</b>	<i>F = 2,35</i> <i>p = 0,06</i>	<i>F = 2,39</i> <i>p &lt; 0,1</i>	F = 0,94 p = n.s.
BLOCK2	<b>F = 11,03</b> <b>p &lt; 0,01</b>	<b>F = 78,64</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 5,95</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 1,63 p = n.s.	<b>F = 3,29</b> <b>p = 0,04</b>	F = 0,92 p = n.s.
BLOCK3	<b>F = 4,95</b> <b>p = 0,03</b>	<b>F = 83,05</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 5,88</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 1,04 p = n.s.	F = 1,91 p = n.s.	F = 0,23 p = n.s.
BLOCK4	<b>F = 8,05</b> <b>p &lt; 0,01</b>	<b>F = 70,14</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 5,79</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 1,19 p = n.s.	<b>F = 4,87</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 0,43 p = n.s.
BLOCK5	<b>F = 9,36</b> <b>p &lt; 0,01</b>	<b>F = 32,29</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 6,60</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 0,69 p = n.s.	F = 1,65 p = n.s.	F = 1,18 p = n.s.
BLOCK6	<b>F = 3,94</b> <b>p &lt; 0,05</b>	<b>F = 40,27</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 5,60</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 1,68 p = n.s.	F = 1,06 p = n.s.	F = 1,20 p = n.s.
BLOCK7	<i>F = 3,32</i> <i>p = 0,07</i>	<b>F = 45,28</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 6,33</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 1,72 p = n.s.	F = 1,02 p = n.s.	F = 1,09 p = n.s.
B1+B2/2	<b>F = 10,95</b> <b>p &lt; 0,01</b>	<b>F = 88,34</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 5,50</b> <b>p &lt; 0,01</b>	<i>F = 2,04</i> <i>p = 0,09</i>	<b>F = 3,10</b> <b>p &lt; 0,05</b>	F = 1,01 p = n.s.
B3+B4/2	<b>F = 7,22</b> <b>p &lt; 0,01</b>	<b>F = 85,94</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 6,56</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 1,20 p = n.s.	<b>F = 3,45</b> <b>p = 0,04</b>	F = 0,32 p = n.s.
B5+B6+B7/3	<b>F = 6,13</b> <b>p = 0,02</b>	<b>F = 47,36</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>F = 7,37</b> <b>p &lt; 0,001</b>	F = 1,39 p = n.s.	F = 1,18 p = n.s.	F = 1,30 p = n.s.
B5 - B4	F = 0,13 p = n.s.	<b>F = 7,34</b> <b>p &lt; 0,01</b>	F = 0,38 p = n.s.	F = 1,38 p = n.s.	F = 1,11 p = n.s.	F = 0,47 p = n.s.
(B567) - (B34)	F = 1,42 p = n.s.	<b>F = 6,34</b> <b>p &lt; 0,01</b>	<i>F = 2,94</i> <i>p = 0,06</i>	F = 1,70 p = n.s.	F = 0,01 p = n.s.	F = 1,55 p = n.s.

Tab. 5b. Ergebnisse der drei-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Embryo-Donatoren, Embryo-Rezipienten und Geschlecht für das Verhalten der Nachkommen der reziproken Embryo-transfers der Stämme C3H, DBA und NMRI. Parameter der Furcht-sensitiven ASR.  
df = Anzahl der Freiheitsgrade

Variable	NMRI in NMRI	NMRI in C3H	NMRI in DBA	C3H in C3H	C3H in NMRI	C3H in DBA	DBA in DBA	DBA in NMRI	DBA in C3H
Motilitätsbox									
LAUF 0005	194,47 ± 3,22	193,00 ± 5,40	212,94 ± 3,06	137,33 ± 9,08	156,80 ± 8,31	141,00 ± 8,16	159,89 ± 7,86	165,41 ± 3,22	168,35 ± 2,71
LAUF 0510	161,41 ± 4,03	165,24 ± 4,02	183,00 ± 2,85	135,94 ± 10,41	140,53 ± 8,71	130,76 ± 8,75	150,78 ± 6,97	157,76 ± 5,31	160,24 ± 5,89
LAUF 0010	355,88 ± 6,16	358,24 ± 8,80	395,94 ± 5,33	273,28 ± 18,37	297,33 ± 15,95	271,76 ± 15,55	310,67 ± 13,30	323,18 ± 7,58	328,59 ± 7,63
WEG 0005	27,36 ± 1,02	22,78 ± 1,10	27,22 ± 1,01	12,76 ± 1,22	16,00 ± 1,23	13,06 ± 1,14	20,09 ± 1,48	22,61 ± 0,78	23,28 ± 0,88
WEG 0510	20,48 ± 0,72	18,44 ± 0,71	21,51 ± 0,72	12,79 ± 1,31	13,93 ± 1,08	12,28 ± 1,26	21,14 ± 1,50	22,80 ± 1,08	23,05 ± 0,94
WEG 0010	47,84 ± 1,45	41,22 ± 1,73	48,72 ± 1,66	25,54 ± 2,39	29,93 ± 2,16	25,49 ± 2,17	41,23 ± 2,78	45,41 ± 1,59	46,34 ± 1,49
AUFRZ 0005	48,06 ± 2,44	54,06 ± 3,40	39,24 ± 2,62	16,78 ± 2,78	17,00 ± 2,74	8,82 ± 1,85	22,56 ± 3,97	32,24 ± 2,00	25,71 ± 1,97
AUFRZ 0510	63,12 ± 4,23	65,82 ± 3,38	50,94 ± 2,98	24,22 ± 3,42	28,40 ± 3,80	12,59 ± 2,90	24,89 ± 3,04	32,53 ± 2,44	36,94 ± 3,81
AUFRZ 0010	111,18 ± 6,04	119,88 ± 6,20	90,18 ± 5,19	41,00 ± 4,90	45,40 ± 5,80	21,41 ± 4,54	47,44 ± 6,50	64,76 ± 3,81	62,65 ± 4,43
ZAUF 0005	77,47 ± 4,26	85,88 ± 6,33	67,06 ± 3,76	23,78 ± 4,44	26,07 ± 4,04	13,18 ± 3,10	33,44 ± 3,93	47,47 ± 3,21	42,59 ± 2,24
ZAUF 0510	86,59 ± 4,28	92,71 ± 3,77	75,82 ± 3,30	33,33 ± 5,81	40,73 ± 6,13	17,88 ± 4,73	45,89 ± 4,66	51,24 ± 3,42	57,82 ± 4,40
ZAUF 0010	164,06 ± 7,50	178,59 ± 9,43	142,88 ± 6,22	57,11 ± 9,46	66,80 ± 9,74	31,06 ± 7,63	79,33 ± 7,66	98,71 ± 6,24	100,41 ± 5,61
MITTE 0005	21,29 ± 1,76	46,18 ± 8,25	37,35 ± 3,44	30,28 ± 7,85	32,13 ± 10,35	47,00 ± 17,29	16,22 ± 2,20	13,76 ± 1,87	14,76 ± 1,92
MITTE 0510	17,88 ± 2,81	28,47 ± 2,99	31,76 ± 3,21	13,17 ± 3,33	15,60 ± 4,32	29,88 ± 15,77	19,44 ± 3,09	19,18 ± 1,58	20,41 ± 2,87
MITTE 0010	39,18 ± 4,22	74,65 ± 9,90	69,12 ± 5,61	43,44 ± 9,48	47,73 ± 11,96	76,88 ± 32,83	35,67 ± 4,67	32,94 ± 2,91	35,18 ± 4,19
EPM									
ZAHL OA	4,00 ± 0,74	3,24 ± 0,73	3,38 ± 0,60	0,53 ± 0,19	0,53 ± 0,19	0,65 ± 0,28	2,00 ± 0,80	1,18 ± 0,32	2,18 ± 0,55
ZAHL GA	14,53 ± 0,96	12,06 ± 0,95	14,50 ± 0,94	3,82 ± 0,62	6,41 ± 1,14	3,82 ± 0,81	8,88 ± 1,89	6,76 ± 1,05	11,18 ± 1,58
ZAHL ZENT	18,94 ± 1,30	15,53 ± 1,47	18,00 ± 1,23	4,47 ± 0,65	7,29 ± 1,23	4,65 ± 0,94	10,88 ± 2,49	8,18 ± 1,33	13,47 ± 2,03
ZEIT OA	35,00 ± 8,25	32,04 ± 7,07	33,19 ± 5,20	25,94 ± 16,49	12,18 ± 4,81	30,94 ± 17,63	14,88 ± 6,29	9,48 ± 2,79	14,53 ± 4,13
ZEIT GA	200,49 ± 11,54	228,49 ± 12,20	198,88 ± 10,37	232,71 ± 20,58	253,02 ± 13,05	245,49 ± 19,01	266,13 ± 12,89	273,41 ± 5,10	255,81 ± 9,27
ZEIT ZENT	62,92 ± 6,49	39,43 ± 5,53	67,94 ± 6,42	41,35 ± 13,15	34,65 ± 9,05	23,57 ± 7,24	19,00 ± 6,66	17,10 ± 2,54	28,76 ± 5,52
OA/OA+GA	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,06	0,06 ± 0,02	0,11 ± 0,06	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,02
OA/Ges.Zeit	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,05	0,04 ± 0,02	0,10 ± 0,06	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01
ASR									
BLOCK1	454,32 ± 53,09	1103,60 ± 185,97	817,10 ± 103,36	1333,52 ± 131,60	1238,73 ± 103,95	1372,17 ± 104,92	370,79 ± 166,57	80,50 ± 21,61	95,75 ± 26,48
BLOCK2	346,04 ± 45,47	999,91 ± 192,27	806,00 ± 108,52	1318,36 ± 151,60	1055,28 ± 104,56	1341,53 ± 116,52	209,71 ± 93,23	57,27 ± 14,09	81,32 ± 28,96
BLOCK3	296,19 ± 49,98	762,80 ± 158,33	703,02 ± 100,73	1199,16 ± 150,17	937,09 ± 106,92	1313,32 ± 78,28	163,70 ± 69,79	43,19 ± 8,40	61,74 ± 15,78
BLOCK4	272,24 ± 43,31	666,94 ± 140,30	709,01 ± 126,08	1149,85 ± 139,27	816,95 ± 112,61	1214,54 ± 130,14	137,58 ± 45,83	54,20 ± 14,38	49,94 ± 17,78
BLOCK5	661,03 ± 123,35	909,87 ± 123,99	931,61 ± 102,65	1277,56 ± 147,36	819,48 ± 100,69	1138,35 ± 91,39	503,89 ± 105,18	219,84 ± 50,83	413,84 ± 97,17
BLOCK6	518,54 ± 87,53	998,09 ± 164,55	1063,25 ± 142,83	1315,36 ± 171,66	943,45 ± 119,24	1115,99 ± 86,44	443,46 ± 107,65	138,54 ± 39,47	199,40 ± 41,55
BLOCK7	444,91 ± 67,38	1006,12 ± 174,23	997,24 ± 138,37	1393,52 ± 175,61	932,53 ± 124,97	1153,39 ± 92,88	339,87 ± 86,42	125,66 ± 41,29	179,11 ± 50,03
B1+B2/2	400,18 ± 43,70	1051,76 ± 187,67	811,55 ± 96,17	1325,94 ± 133,54	1147,00 ± 99,54	1356,85 ± 106,32	290,25 ± 129,13	68,89 ± 16,98	88,54 ± 25,57
B3+B4/2	284,21 ± 44,63	714,87 ± 137,21	706,02 ± 110,01	1174,51 ± 140,05	877,02 ± 107,38	1263,93 ± 96,84	150,64 ± 56,34	48,69 ± 10,77	55,84 ± 16,56
B5+B6+B7/3	541,49 ± 86,27	971,36 ± 142,91	997,36 ± 114,35	1328,81 ± 160,96	898,49 ± 103,67	1135,91 ± 76,36	429,07 ± 94,03	161,35 ± 39,05	264,11 ± 54,76
B5 – B4	338,79 ± 101,72	242,94 ± 119,14	222,59 ± 101,59	127,71 ± 127,23	2,54 ± 90,56	-76,18 ± 102,27	366,31 ± 69,46	165,64 ± 47,98	363,90 ± 87,61
(B567)–(B34)	1056,05 ± 204,97	1484,35 ± 257,05	1580,06 ± 203,47	1637,42 ± 343,18	941,43 ± 260,32	879,87 ± 160,67	985,93 ± 189,08	386,65 ± 110,49	680,66 ± 144,98

Tab.6. Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.) der untersuchten Parameter der Motilitätsbox, des Elevated Plus-Maze und der Furcht-sensitiven akustischen Schreckreaktion bei den Nachkommen der reziproken Transfergruppen der Stämme C3H, DBA und NMRI.

ANOVA und Tukey-Tests der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in definierte Rezipienten															
Variable	ANOVA (df = 2)		Tukey-Test			ANOVA (df = 2)		Tukey-Test			ANOVA (df = 2)		Tukey-Test		
	CC-DC-NC		CC-DC	CC-NC	DC-NC	DD-CD-ND		DD-CD	DD-ND	CD-ND	NN-DN-CN		NN-DN	NN-CN	DN-CN
	F-Werte	p-Werte				F-Werte	p-Werte				F-Werte	p-Werte			
Motilitätsbox															
LAUF 0005	19,00	< 0,001	+	+	+	36,68	< 0,001	-	+	+	14,57	< 0,001	+	+	-
LAUF 0510	4,52	0,02	-	+	-	17,69	< 0,001	-	+	+	3,19	0,05			
LAUF 0010	11,42	< 0,001	+	+	-	31,29	< 0,001	-	+	+	8,00	< 0,01	-	+	-
WEG 0005	30,55	< 0,001	+	+	-	43,09	< 0,001	+	+	+	30,80	< 0,001	+	+	+
WEG 0510	25,20	< 0,001	+	+	+	22,59	< 0,001	+	-	+	21,73	< 0,001	-	+	+
WEG 0010	32,11	< 0,001	+	+	-	36,49	< 0,001	+	-	+	30,31	< 0,001	-	+	+
AUFZR 0005	48,96	< 0,001	-	+	+	40,09	< 0,001	+	+	+	41,37	< 0,001	+	+	+
AUFZR 0510	36,30	< 0,001	+	+	+	47,82	< 0,001	+	+	+	28,74	< 0,001	+	+	-
AUFZR 0010	60,90	< 0,001	+	+	+	50,89	< 0,001	+	+	+	40,82	< 0,001	+	+	+
ZAUFR 0005	47,16	< 0,001	+	+	+	66,04	< 0,001	+	+	+	44,17	< 0,001	+	+	+
ZAUFR 0510	39,01	< 0,001	+	+	+	53,83	< 0,001	+	+	+	27,07	< 0,001	+	+	-
ZAUFR 0010	53,71	< 0,001	+	+	+	69,72	< 0,001	+	+	+	39,99	< 0,001	+	+	+
MITTE 0005	5,36	< 0,01	-	-	+	1,32	n.s.				2,56	0,09			
MITTE 0510	6,22	< 0,01	-	+	-	0,27	n.s.				0,35	n.s.			
MITTE 0010	6,15	< 0,01	-	+	+	0,69	n.s.				1,08	n.s.			
<b>Elevated Plus-Maze</b>															
ZAHL OA	6,49	< 0,01	-	+	-	8,00	< 0,01	-	-	+	14,89	< 0,001	+	+	-
ZAHL GA	16,89	< 0,001	+	+	-	30,29	< 0,001	+	+	+	19,01	< 0,001	+	+	-
ZAHL ZENT	16,09	< 0,001	+	+	-	29,50	< 0,001	+	+	+	25,40	< 0,001	+	+	-
ZEIT OA	0,70	n.s.				0,39	n.s.				5,96	< 0,01	+	+	-
ZEIT GA	0,94	n.s.				4,27	0,02	-	+	-	12,88	< 0,001	+	+	-
ZEIT ZENT	0,56	n.s.				14,70	< 0,001	-	+	+	12,29	< 0,001	+	+	-
OA/OA+GA	0,74	n.s.				0,70	n.s.				5,65	< 0,01	+	+	-
OA/Ges.Zeit	0,59	n.s.				0,39	n.s.				5,97	< 0,01	+	+	-
<b>Schreckreaktion</b>															
BLOCK1	24,72	< 0,001	+	-	+	16,07	< 0,001	+	+	+	74,45	< 0,001	+	+	+
BLOCK2	20,36	< 0,001	+	-	+	20,61	< 0,001	+	+	+	59,30	< 0,001	+	+	+
BLOCK3	20,64	< 0,001	+	+	+	34,50	< 0,001	+	+	+	45,23	< 0,001	+	+	+
BLOCK4	23,15	< 0,001	+	+	+	15,43	< 0,001	+	+	+	30,81	< 0,001	-	+	+
BLOCK5	12,11	< 0,001	+	-	+	7,99	< 0,01	+	+	-	11,28	< 0,001	+	-	+
BLOCK6	17,02	< 0,001	+	-	+	7,12	< 0,01	+	+	-	21,49	< 0,001	+	+	+
BLOCK7	18,12	< 0,001	+	-	+	10,03	< 0,001	+	+	-	22,77	< 0,001	+	+	+
B1+B2/2	23,59	< 0,001	+	-	+	20,66	< 0,001	+	+	+	74,83	< 0,001	+	+	+
B3+B4/2	24,50	< 0,001	+	+	+	25,04	< 0,001	+	+	+	39,54	< 0,001	-	+	+
B5+B6+B7/3	17,85	< 0,001	+	-	+	10,58	< 0,001	+	+	-	21,68	< 0,001	+	+	+
B5 – B4	1,10	n.s.				4,57	0,02	+	-	-	5,45	< 0,01	-	+	-
(B567) – (B34)	3,87	0,03	+	-	-	4,40	0,02	-	-	+	3,17	0,05			

Tab.7.

Tab.7. Bestimmung der genetischen Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen durch den Vergleich der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in Rezipientenselben Stammes. Ergebnisse der ein-faktoriellen ANOVAs und der anschließenden Tukey-Tests für die untersuchten Parameter der Transfergruppen in der Motilitätsbox, auf dem Elevated Plus-Maze und in der Furcht-sensitvierten akustischen Schreckreaktion. df = Anzahl der Freiheitsgrade

CC-DC-NC = Vergleich der Transfers von C3H-, DBA- und NMRI-Blastozysten in C3H-Rezipienten

DD-CD-ND = Vergleich der Transfers von DBA-, C3H- und NMRI-Blastozysten in DBA-Rezipienten

NN-DN-CN = Vergleich der Transfers von NMRI-, DBA- und C3H-Blastozysten in NMRI-Rezipienten

CC – DC = Vergleich der Transfers von C3H- und DBA-Blastozysten in C3H-Rezipienten

CC – NC = Vergleich der Transfers von C3H- und NMRI-Blastozysten in C3H-Rezipienten

DC – NC = Vergleich der Transfers von DBA- und NMRI-Blastozysten in C3H-Rezipienten

DD – CD = Vergleich der Transfers von DBA- und C3H-Blastozysten in DBA-Rezipienten

DD – ND = Vergleich der Transfers von DBA- und NMRI-Blastozysten in DBA-Rezipienten

CD – ND = Vergleich der Transfers von C3H- und NMRI-Blastozysten in DBA-Rezipienten

NN – DN = Vergleich der Transfers von NMRI- und DBA-Blastozysten in NMRI-Rezipienten

NN – CN = Vergleich der Transfers von NMRI- und C3H-Blastozysten in NMRI-Rezipienten

DN – CN = Vergleich der Transfers von DBA- und C3H-Blastozysten in NMRI-Rezipienten

Tab.8. Bestimmung der maternalen Einflüsse auf das Verhalten der Nachkommen durch den Vergleich der Transfers von genetisch identischen Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme. Ergebnisse der ein-faktoriellen ANOVAs und der anschließenden Tukey-Tests für die untersuchten Parameter der Transfergruppen in der Motilitätsbox, auf dem Elevated Plus-Maze und in der Furcht-sensitvierten akustischen Schreckreaktion. df = Anzahl der Freiheitsgrade

CC-CD-CN = Vergleich der Transfers von C3H-Blastozysten in C3H-, DBA- und NMRI-Rezipienten

DD-DC-DN = Vergleich der Transfers von DBA-Blastozysten in DBA-, C3H- und NMRI-Rezipienten

NN-ND-NC = Vergleich der Transfers von NMRI-Blastozysten in NMRI-, DBA- und C3H-Rezipienten

CC – CD = Vergleich der Transfers von C3H-Blastozysten in C3H- und DBA-Rezipienten

CC – CN = Vergleich der Transfers von C3H-Blastozysten in C3H- und NMRI-Rezipienten

CN – CD = Vergleich der Transfers von C3H-Blastozysten in NMRI- und DBA-Rezipienten

DD – DC = Vergleich der Transfer von DBA-Blastozysten in DBA- und C3H-Rezipienten

DD – DN = Vergleich der Transfer von DBA-Blastozysten in DBA- und NMRI-Rezipienten

DC – DN = Vergleich der Transfer von DBA-Blastozysten in C3H- und NMRI-Rezipienten

NN – ND = Vergleich der Transfers von NMRI-Blastozysten in NMRI- und DBA-Rezipienten

NN – NC = Vergleich der Transfers von NMRI-Blastozysten in NMRI- und C3H-Rezipienten

ND – NC = Vergleich der Transfers von NMRI-Blastozysten in DBA- und C3H-Rezipienten

ANOVA und Tukey-Teste der Transfers von Blastozysten in genetisch unterschiedliche Rezipienten															
Variable	ANOVA (df = 2)		Tukey-Test			ANOVA (df = 2)		Tukey-Test			ANOVA (df = 2)		Tukey-Test		
	CC-CD-CN		CC-CD	CC-CN	CN-CD	DD-DC-DN		DD-DC	DD-DN	DC-DN	NN-ND-NC		NN-ND	NN-NC	ND-NC
	F-Werte	p-Werte				F-Werte	p-Werte				F-Werte	p-Werte			
Motilitätsbox															
LAUF 0005	1,38	n.s.				0,91	n.s.				7,57	< 0,01	+	-	+
LAUF 0510	0,26	n.s.				0,52	n.s.				9,83	< 0,001	+	-	+
LAUF 0010	0,68	n.s.				0,86	n.s.				10,54	< 0,001	+	-	+
WEG 0005	2,10	n.s.				2,30	n.s.				6,21	< 0,01	-	+	+
WEG 0510	0,43	n.s.				0,64	n.s.				4,75	0,01	-	-	+
WEG 0010	1,20	n.s.				1,74	n.s.				6,41	< 0,01	-	+	+
AUFRZ 0005	3,51	0,04	(+)			4,01	0,03	-	+	-	6,84	< 0,01	-	-	+
AUFRZ 0510	5,80	< 0,01	+	-	+	2,75	0,08				4,94	0,01	-	-	+
AUFRZ 0010	6,32	< 0,01	+	-	+	3,11	0,06				6,86	< 0,01	+	-	+
ZAUFR 0005	3,04	0,06				4,38	0,02	-	+	-	3,69	0,03	-	-	+
ZAUFR 0510	4,27	0,02	-	-	+	1,80	n.s.				5,05	0,01	-	-	+
ZAUFR 0010	4,16	0,02	-	-	+	2,51	0,09				5,26	< 0,01	-	-	+
MITTE 0005	0,55	n.s.				0,31	n.s.				5,76	< 0,01	-	+	-
MITTE 0510	0,87	n.s.				0,08	n.s.				5,82	< 0,01	+	+	-
MITTE 0010	0,76	n.s.				0,14	n.s.				7,42	< 0,01	+	+	-
<b>Elevated Plus-Maze</b>															
ZAHL OA	0,09	n.s.				1,25	n.s.				0,35	n.s.			
ZAHL GA	2,87	0,07				2,84	0,07				2,24	n.s.			
ZAHL ZENT	2,67	0,08				2,47	< 0,1				1,75	n.s.			
ZEIT OA	0,47	n.s.				0,60	n.s.				0,05	n.s.			
ZEIT GA	0,33	n.s.				1,32	n.s.				2,14	n.s.			
ZEIT ZENT	0,79	n.s.				1,99	n.s.				6,14	< 0,01	-	+	+
OA/OA+GA	0,30	n.s.				0,89	n.s.				0,13	n.s.			
OA/Ges.Zeit	0,47	n.s.				0,75	n.s.				0,05	n.s.			
Schreckreaktion															
BLOCK1	0,36	n.s.				4,93	0,01	+	+	-	5,99	< 0,01	-	+	-
BLOCK2	1,60	n.s.				3,20	0,05	-	+	-	5,96	< 0,01	-	+	-
BLOCK3	2,78	0,07				4,16	0,02	-	+	-	4,59	0,02	+	+	-
BLOCK4	2,79	0,07				3,56	0,04	+	-	-	4,14	0,02	+	-	-
BLOCK5	4,11	0,02	-	+	-	2,80	0,07				1,59	n.s.			
BLOCK6	2,03	n.s.				6,57	< 0,01	+	+	-	4,38	0,02	+	-	-
BLOCK7	2,90	0,07				3,26	< 0,05	-	+	-	5,15	0,01	+	+	-
B1+B2/2	0,99	n.s.				4,42	0,02	+	+	-	6,31	< 0,01	-	+	-
B3+B4/2	3,04	0,06				4,14	0,02	+	+	-	4,93	0,01	+	+	-
B5+B6+B7/3	3,28	< 0,05	-	+	-	4,53	0,02	-	+	-	4,41	0,02	+	+	-
B5 – B4	0,91	n.s.				2,66	0,08				0,67	n.s.			
(B567) – (B34)	2,51	0,09				3,77	0,03	-	+	-	1,47	n.s.			

Tab.8.

Variable	ANOVA (df = 2)		Tukey-Tests			ANOVA (df = 2)		Tukey-Tests			ANOVA (df = 2)		Tukey-Tests		
	CC-DC-NC		CC-DC	CC-NC	DC-NC	DD-CD-ND		DD-CD	DD-ND	CD-ND	NN-DN-CN		NN-DN	NN-CN	DN-CN
	F-Werte	p-Werte				F-Werte	p-Werte				F-Werte	p-Werte			
<b>Aktivität</b>	37,62	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	-	49,94	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+	30,71	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+
<b>Aufrichtung</b>	26,57	<b>&lt; 0,001</b>	-	+	+	32,93	<b>&lt; 0,001</b>	-	+	+	28,82	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	-
<b>Angst</b>	1,53	n.s.				1,51	n.s.				2,29	n.s.			
<b>Schreckhaftigkeit</b>	24,60	<b>&lt; 0,001</b>	+	-	+	19,15	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+	44,80	<b>&lt; 0,001</b>	+	+	+

Tab.9a. Summenscores der vier Hauptkriterien des Verhaltens: Bestimmung der genetischen Einflüsse auf die Hauptkriterien des Verhaltens durch den Vergleich der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in Rezipienten des selben Stammes. Ergebnisse der ANOVAs und der anschließenden Tukey-Tests.

CC-DC-NC = Vergleich der Transfers von C3H-, DBA- und NMRI-Blastozysten in C3H- Rezipienten  
DD-CD-ND = Vergleich der Transfers von DBA-, C3H- und NMRI-Blastozysten in DBA- Rezipienten  
NN-DN-CN = Vergleich der Transfers von NMRI-, DBA- und C3H- Blastozysten in NMRI-Rezipienten

Variable	ANOVA (df = 2)		Tukey-Tests			ANOVA (df = 2)		Tukey-Tests			ANOVA (df = 2)		Tukey-Tests		
	CC-CD-CN		CC-CD	CC-CN	CN-CD	DD-DC-DN		DD-DC	DD-DN	DC-DN	NN-ND-NC		NN-ND	NN-NC	ND-NC
	F-Werte	p-Werte				F-Werte	p-Werte				F-Werte	p-Werte			
<b>Aktivität</b>	2,34	n.s.				2,40	n.s.				5,45	<b>&lt; 0,01</b>	-	+	+
<b>Aufrichtung</b>	5,85	<b>&lt; 0,01</b>	+	-	+	3,18	0,05				7,37	<b>&lt; 0,01</b>	+	-	+
<b>Angst</b>	1,94	n.s.				0,28	n.s.				0,07	n.s.			
<b>Schreckhaftigkeit</b>	2,75	0,07				5,08	<b>0,01</b>	-	+	-	5,53	<b>&lt; 0,01</b>	+	+	-

Tab.9b. Summenscores der vier Hauptkriterien des Verhaltens: Bestimmung der maternalen Einflüsse auf die Hauptkriterien des Verhaltens durch den Vergleich der Transfers von genetisch identischen Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme. Ergebnisse der ANOVAs und der anschließenden Tukey-Tests.

CC-CD-CN = Vergleich der Transfers von C3H- Blastozysten in C3H-, DBA- und NMRI-Rezipienten  
DD-DC-DN = Vergleich der Transfers von DBA- Blastozysten in DBA-, C3H- und NMRI-Rezipienten  
NN-ND-NC = Vergleich der Transfers von NMRI-Blastozysten in NMRI-, DBA- und C3H- Rezipienten

Variable	Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte			Uterine Effekte			Postnatale Effekte		
	NMRI in NMRI	NMRI in C3H	NMRI in C3H in NMRI	NMRI in NMRI – NMRI in C3H in NMRI			NMRI in C3H – NMRI in C3H in NMRI		
				df	t–Werte	p–Werte	df	t–Werte	p–Werte
Motilitätsbox									
LAUF 0005	194,47 ± 3,22	193,00 ± 5,40	208,24 ± 6,29	23,8	1,95	0,06	31,3	1,84	0,08
LAUF 0510	161,41 ± 4,03	165,24 ± 4,02	179,35 ± 7,97	23,7	2,01	0,06	23,6	1,58	n.s.
LAUF 0010	355,88 ± 6,16	358,24 ± 8,80	387,59 ± 14,02	22,0	2,07	0,05	26,9	1,77	0,09
WEG 0005	27,36 ± 1,02	22,78 ± 1,10	29,52 ± 2,02	23,6	0,95	n.s.	24,7	2,93	< 0,01
WEG 0510	20,48 ± 0,72	18,44 ± 0,71	22,96 ± 2,00	20,0	1,17	n.s.	19,9	2,13	< 0,05
WEG 0010	47,84 ± 1,45	41,22 ± 1,73	52,48 ± 3,95	20,2	1,10	n.s.	21,9	2,61	0,02
AUFRZ 0005	48,06 ± 2,44	54,06 ± 3,40	35,35 ± 2,94	31,0	-3,33	< 0,01	31,3	-4,16	< 0,001
AUFRZ 0510	63,12 ± 4,23	65,82 ± 3,38	47,59 ± 4,21	32,0	-2,60	0,01	30,6	-3,38	< 0,01
AUFRZ 0010	111,18 ± 6,04	119,88 ± 6,20	82,94 ± 6,64	31,7	-3,15	< 0,01	31,9	-4,07	< 0,001
ZAUFZ 0005	77,47 ± 4,26	85,88 ± 6,33	57,94 ± 3,87	31,7	-3,39	< 0,01	26,5	-3,77	< 0,001
ZAUFZ 0510	86,59 ± 4,28	92,71 ± 3,77	68,94 ± 4,97	31,3	-2,69	0,01	29,9	-3,81	< 0,001
ZAUFZ 0010	164,06 ± 7,50	178,59 ± 9,43	126,88 ± 8,30	31,7	-3,32	< 0,01	31,5	-4,12	< 0,001
MITTE 0005	21,29 ± 1,76	46,18 ± 8,25	31,88 ± 3,79	22,6	2,54	0,02	22,5	-1,58	n.s.
MITTE 0510	17,88 ± 2,81	28,47 ± 2,99	30,94 ± 3,83	29,3	2,75	0,01	30,2	0,51	n.s.
MITTE 0010	39,18 ± 4,22	74,65 ± 9,90	62,82 ± 6,16	28,3	3,17	< 0,01	26,8	-1,01	n.s.
Elevated Plus-Maze									
ZAHL OA	4,00 ± 0,74	3,24 ± 0,73	1,76 ± 0,52	28,7	-2,48	0,02	28,9	-1,64	n.s.
ZAHL GA	14,53 ± 0,96	12,06 ± 0,95	13,53 ± 1,07	31,6	-0,69	n.s.	31,6	1,03	n.s.
ZAHL ZENT	18,94 ± 1,30	15,53 ± 1,47	15,47 ± 1,39	31,9	-1,82	0,08	31,9	-0,03	n.s.
ZEIT OA	35,00 ± 8,25	32,04 ± 7,07	20,94 ± 4,91	26,1	-1,46	n.s.	28,5	-1,29	n.s.
ZEIT GA	200,49 ± 11,54	228,49 ± 12,20	229,00 ± 10,84	31,9	1,80	0,08	31,6	0,03	n.s.
ZEIT ZENT	62,92 ± 6,49	39,43 ± 5,53	50,06 ± 7,32	31,5	-1,31	n.s.	29,8	1,16	n.s.
OA/OA+GA	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,09 ± 0,02	26,4	-1,43	n.s.	29,2	-1,09	n.s.
OA/Ges.Zeit	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,02	26,1	-1,47	n.s.	28,5	-1,29	n.s.
Schreckreaktion									
BLOCK1	454,32 ± 53,09	1103,60 ± 185,97	1608,54 ± 209,63	18,0	5,34	< 0,001	31,6	1,80	0,08
BLOCK2	346,04 ± 45,47	999,91 ± 192,27	1725,68 ± 231,71	17,2	5,84	< 0,001	30,9	2,41	0,02
BLOCK3	296,19 ± 49,98	762,80 ± 158,33	1562,22 ± 227,03	17,5	5,45	< 0,001	28,6	2,89	< 0,01
BLOCK4	272,24 ± 43,31	666,94 ± 140,30	1446,19 ± 197,18	17,5	5,81	< 0,001	28,9	3,22	< 0,01
BLOCK5	661,03 ± 123,35	909,87 ± 123,99	1538,82 ± 160,68	28,9	4,33	< 0,001	30,1	3,10	< 0,01
BLOCK6	518,54 ± 87,53	998,09 ± 164,55	1562,22 ± 143,32	26,0	6,21	< 0,001	31,4	2,59	0,02
BLOCK7	444,91 ± 67,38	1006,12 ± 174,23	1599,65 ± 182,06	20,2	5,95	< 0,001	31,9	2,36	0,03
B1+B2/2	400,18 ± 43,70	1051,76 ± 187,67	1667,11 ± 216,20	17,3	5,74	< 0,001	31,4	2,15	0,04
B3+B4/2	284,21 ± 44,63	714,87 ± 137,21	1504,21 ± 199,90	17,6	5,96	< 0,001	28,3	3,26	< 0,01
B5+B6+B7/3	541,49 ± 86,27	971,36 ± 142,91	1566,89 ± 151,74	25,0	5,87	< 0,001	31,9	2,86	< 0,01
B5 - B4	338,79 ± 101,72	242,94 ± 119,14	92,62 ± 165,35	26,1	-1,53	n.s.	29,1	-0,74	n.s.
(B567)-(B34)	1056,05 ± 204,97	1484,35 ± 257,05	1692,27 ± 260,42	29,2	1,92	0,07	32,0	0,57	n.s.

Tab.10.

Tab.10. Bestimmung von uterinen und postnatalen Effekten auf die Verhaltensparameter von NMRI-Mäusen in der Motilitätsbox, auf dem Elevated Plus-Maze und in der Furcht-sensitiven akustischen Schreckreaktion. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der Verhaltensparameter der zur Bestimmung der uterinen und postnatalen Effekte verwendeten Transfergruppen (NMRI in NMRI, NMRI in C3H und NMRI in C3H in NMRI), sowie die Ergebnisse der t-Tests für die Einflüsse von uterinen Faktoren (Vergleich der Transfergruppen NMRI in NMRI und NMRI in C3H in NMRI) und postnatalen Faktoren (Vergleich der Transfergruppen NMRI in C3H und NMRI in C3H in NMRI).

df = Anzahl der Freiheitsgrade

Gruppe NMRI in C3H in NMRI: Transfer von NMRI-Blastozysten in C3H-Rezipienten und anschließende Adoption durch eine NMRI-Amme.

Variable	Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte				Transfereffekt					
	C3H-Kontrolle	C3H in C3H	DBA-Kontrolle	DBA in DBA	C3H			DBA		
					df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte
NPY-BM	255,75 ± 30,02	229,25 ± 20,13	231,25 ± 10,25	150,25 ± 9,44	8,74	-0,73	n.s.	9,93	-5,81	< 0,001
NPY-L	445,50 ± 33,91	410,50 ± 34,62	419,25 ± 34,99	315,25 ± 11,08	10,0	-0,72	n.s.	5,99	-2,83	0,03
NPY-BL	551,25 ± 38,02	495,25 ± 33,76	544,25 ± 8,84	448,50 ± 12,79	9,86	-1,10	n.s.	8,89	-6,16	< 0,001
NPY-BLA	1252,50 ± 92,89	1135,00 ± 71,84	1194,75 ± 48,73	914,00 ± 19,83	9,41	-1,00	n.s.	6,61	-5,34	< 0,01
NPY-CeAc	545,50 ± 28,97	550,75 ± 19,78	445,75 ± 19,64	398,00 ± 24,50	8,83	0,15	n.s.	9,55	-1,52	n.s.
NPY-CeAm	127,25 ± 24,49	110,75 ± 16,55	83,00 ± 6,60	47,50 ± 4,74	8,78	-0,56	n.s.	9,07	-4,37	< 0,01
NPY-CeAl	115,25 ± 17,70	130,50 ± 21,92	116,00 ± 21,93	47,00 ± 4,49	9,58	0,54	n.s.	5,42	-3,08	0,03
NPY-CeA	788,00 ± 62,32	792,00 ± 35,67	644,75 ± 27,62	492,50 ± 21,08	7,96	0,06	n.s.	9,35	-4,38	< 0,01

Tab.11. Mittelwerte mit Standardfehlern (S.E.M.) für die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen der Mäusestämme DBA und C3H sowie deren isogenen Transfergruppen. Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse der t-Tests zur Ermittlung des Effektes der Embryo-transferprozedur durch den Vergleich der unbehandelten Kontrolltiere eines jeden Stammes mit den zugehörigen isogenen Transfergruppen.

df = Anzahl der Freiheitsgrade

Variable	Vergleich Kontrollen			Vergleich isogene Transfers		
	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte
NPY-BM	6,15	0,77	n.s.	7,1	3,55	< 0,01
NPY-L	9,99	0,54	n.s.	6,01	2,62	0,04
NPY-BL	5,54	0,18	n.s.	6,41	1,30	n.s.
NPY-BLA	7,56	0,55	n.s.	5,76	2,97	0,03
NPY-CeAc	8,8	2,85	0,02	9,57	4,85	< 0,001
NPY-CeAm	5,72	1,74	n.s.	5,81	3,67	0,01
NPY-CeAl	9,57	-0,03	n.s.	5,42	3,73	0,01
NPY-CeA	6,89	2,10	0,07	8,11	7,23	< 0,001

Tab.12. Ergebnisse der t-Tests für den Vergleich der Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakerengebieten der Stämme C3H und DBA sowie deren isogenen Transfergruppen.

df = Anzahl der Freiheitsgrade

Variable	Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte			
	C3H in C3H	C3H in DBA	DBA in DBA	DBA in C3H
NPY-BM	229,25 ± 20,13	217,50 ± 8,52	150,25 ± 9,44	189,25 ± 13,66
NPY-L	410,50 ± 34,62	495,00 ± 30,16	315,12 ± 11,08	403,00 ± 38,47
NPY-BL	495,25 ± 33,76	568,75 ± 54,88	448,50 ± 12,79	547,00 ± 38,48
NPY-BLA	1135,00 ± 71,84	1281,25 ± 83,50	914,00 ± 19,83	1139,25 ± 75,88
NPY-CeAc	550,75 ± 19,78	549,25 ± 17,88	398,00 ± 24,50	428,00 ± 21,60
NPY-CeAm	110,75 ± 16,55	112,00 ± 12,21	47,50 ± 4,74	72,50 ± 6,50
NPY-CeAl	130,50 ± 21,92	115,00 ± 25,16	47,00 ± 4,49	87,50 ± 12,26
NPY-CeA	792,00 ± 35,67	776,25 ± 29,29	492,50 ± 21,08	588,00 ± 30,32

Tab.13. Mittelwerte mit Standardfehlern (S.E.M.) für die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen der Nachkommen der reziproken Transfers der Stämme C3H und DBA

Variable	Maternale Einflüsse						Genetische Einflüsse					
	CC - CD			DD - DC			CC - DC			DD - CD		
	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte
NPY-BM	6,74	0,54	n.s.	8,89	2,35	<b>0,04</b>	8,8	1,64	n.s.	9,9	5,29	<b>&lt; 0,001</b>
NPY-L	9,82	-1,84	<b>&lt; 0,1</b>	5,82	2,19	<b>0,07</b>	9,89	0,14	n.s.	6,33	5,59	<b>&lt; 0,01</b>
NPY-BL	8,31	-1,14	n.s.	6,09	2,43	<b>0,05</b>	9,83	-1,01	n.s.	5,54	2,13	<b>0,08</b>
NPY-BLA	9,78	-1,33	n.s.	5,68	2,87	<b>0,03</b>	9,97	-0,04	n.s.	5,56	4,28	<b>&lt; 0,01</b>
NPY-CeAc	9,9	0,06	n.s.	9,85	0,92	n.s.	9,92	4,19	<b>&lt; 0,01</b>	9,15	4,99	<b>&lt; 0,001</b>
NPY-CeAm	9,2	-0,06	n.s.	9,14	3,11	<b>0,01</b>	6,51	2,15	<b>0,07</b>	6,47	4,92	<b>&lt; 0,01</b>
NPY-CeAl	9,82	0,46	n.s.	6,32	3,10	<b>0,02</b>	7,85	1,71	n.s.	5,32	2,66	<b>0,04</b>
NPY-CeA	9,64	0,34	n.s.	8,92	2,59	<b>0,03</b>	9,75	4,36	<b>&lt; 0,01</b>	9,08	7,86	<b>&lt; 0,001</b>

Tab.14. Ergebnisse der t-Tests zur Bestimmung von maternalen und genetischen Einflüssen auf die Anzahl NPY-immunpositiver Neurone in den Amygdalakerengebieten der Stämme C3H und DBA. Bestimmung von maternalen Einflüssen durch den Vergleich der Transfers von genetisch identischen Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme (CC-CD und DD-DC) und von genetischen Einflüssen durch den Vergleich der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in Rezipienten des selben Stammes (CC-DC und DD-CD). df = Anzahl der Freiheitsgrade

CC-CD = Vergleich der Transfers von C3H-Blastozysten in C3H- und DBA-Rezipienten

DD-DC = Vergleich der Transfers von DBA-Blastozysten in DBA- und C3H-Rezipienten

CC-DC = Vergleich der Transfers von C3H- und DBA-Blastozysten in C3H-Rezipienten

DD-CD = Vergleich der Transfers von DBA- und C3H-Blastozysten in DBA-Rezipienten

Variable	Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte				Transfereffekt					
	C3H-Kontrolle	C3H in C3H	DBA-Kontrolle	DBA in DBA	C3H			DBA		
					df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte
PARV-BM	1017,75 ± 57,32	869,75 ± 101,70	1220,50 ± 52,40	1124,50 ± 100,47	7,89	-1,27	n.s.	7,53	-0,85	n.s.
PARV-L	1190,50 ± 69,99	1129,25 ± 50,86	1629,75 ± 97,36	1573,50 ± 110,50	9,13	-0,71	n.s.	9,84	-0,38	n.s.
PARV-BL	4898,50 ± 286,40	3873,75 ± 270,65	5314,50 ± 241,88	4722,75 ± 257,42	9,97	-2,60	<b>0,03</b>	9,96	-1,68	n.s.
PARV-BLA	7106,75 ± 342,80	5872,75 ± 267,92	8164,75 ± 340,24	7420,75 ± 417,88	9,45	-2,84	<b>0,02</b>	9,61	-1,38	n.s.
PARV-CeAc	143,50 ± 15,29	156,25 ± 10,35	182,75 ± 13,01	200,75 ± 15,91	8,79	0,69	n.s.	9,62	0,88	n.s.
PARV-CeAm	96,25 ± 12,21	86,75 ± 16,60	110,75 ± 7,71	104,75 ± 9,62	9,19	-0,46	n.s.	9,55	-0,49	n.s.
PARV-CeAl	23,00 ± 2,97	15,75 ± 4,74	38,00 ± 7,17	30,50 ± 8,71	8,4	-1,30	n.s.	9,64	-0,66	n.s.
PARV-CeA	262,75 ± 20,71	258,75 ± 23,70	331,50 ± 20,28	336,00 ± 28,73	9,82	-0,13	n.s.	8,99	0,13	n.s.

Tab.15. Mittelwerte mit Standardfehlern (S.E.M.) für die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den Amygdalakernen der Stämme C3H und DBA sowie deren isogenen Transfergruppen. Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse der t-Tests zur Ermittlung des Effektes der Embryotransferprozedur durch den Vergleich der unbehandelten Kontrolltiere eines jeden Stammes mit den zugehörigen isogenen Transfergruppen.

df = Anzahl der Freiheitsgrade

Variable	Vergleich Kontrollen			Vergleich der isogenen Transfers		
	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte
PARV-BM	9,92	-2,61	<b>0,03</b>	10,0	-1,78	n.s.
PARV-L	9,08	-3,66	<b>&lt; 0,01</b>	7,03	-3,65	<b>&lt; 0,01</b>
PARV-BL	9,73	-1,11	n.s.	9,98	-2,27	<b>&lt; 0,05</b>
PARV-BLA	10,0	-2,19	<i>0,05</i>	8,52	-3,12	<b>0,01</b>
PARV-CeAc	9,75	-1,96	<i>0,08</i>	8,59	-2,34	<b>&lt; 0,05</b>
PARV-CeAm	8,44	-1,00	n.s.	8,02	-0,94	n.s.
PARV-CeAl	6,66	-1,93	<i>&lt; 0,1</i>	7,72	-1,49	n.s.
PARV-CeA	10,0	-2,37	<b>0,04</b>	9,65	-2,07	<i>0,07</i>

Tab. 16. Ergebnisse der t-Tests für den Vergleich der Anzahl PARV-immunpositiver Zellen in den Amygdalakernen der Stämme C3H und DBA sowie deren isogenen Transfergruppen.

df = Anzahl der Freiheitsgrade

Variable	Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte			
	C3H in C3H	C3H in DBA	DBA in DBA	DBA in C3H
PARV-BM	869,75 ± 101,70	1265,40 ± 64,25	1124,50 ± 100,47	1284,75 ± 108,04
PARV-L	1129,25 ± 50,86	1336,00 ± 68,86	1573,50 ± 110,50	1470,75 ± 85,53
PARV-BL	3873,75 ± 270,65	4487,00 ± 206,85	4722,75 ± 257,42	4814,25 ± 297,63
PARV-BLA	5872,75 ± 267,92	7005,30 ± 455,91	7420,75 ± 417,88	7569,75 ± 377,76
PARV-CeAc	156,25 ± 10,35	147,25 ± 13,59	200,75 ± 15,91	217,25 ± 13,66
PARV-CeAm	86,75 ± 16,60	70,00 ± 11,79	104,75 ± 9,62	98,50 ± 15,03
PARV-CeAl	15,75 ± 4,74	13,75 ± 3,39	30,50 ± 8,71	24,50 ± 8,50
PARV-CeA	258,75 ± 23,70	231,00 ± 18,05	336,00 ± 28,73	340,25 ± 15,58

Tab.17. Mittelwerte mit Standardfehlern (S.E.M.) für die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den verschiedenen Amygdalakernen der Nachkommen der reziproken Transfers der Stämme C3H und DBA.

Variable	Maternale Einflüsse						Genetische Einflüsse					
	CC - CD			DD - DC			CC - DC			DD - CD		
	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte	df	t-Werte	p-Werte
PARV-BM	8,5	-3,20	<b>0,01</b>	9,95	1,09	n.s.	9,96	-2,80	<b>0,02</b>	8,54	1,15	n.s.
PARV-L	9,2	-2,42	<b>0,04</b>	9,41	-0,74	n.s.	8,14	-3,43	<b>&lt; 0,01</b>	8,37	-1,82	n.s.
PARV-BL	9,36	-1,80	n.s.	9,8	0,23	n.s.	9,91	-2,34	<b>0,04</b>	9,56	-0,71	n.s.
PARV-BLA	8,79	-3,36	<b>&lt; 0,01</b>	9,9	0,26	n.s.	9,01	-3,66	<b>&lt; 0,01</b>	7,16	-0,89	n.s.
PARV-CeAc	9,34	0,53	n.s.	9,78	0,79	n.s.	9,32	-3,56	<b>&lt; 0,01</b>	9,76	-2,56	<b>0,03</b>
PARV-CeAm	9,02	0,82	n.s.	8,51	-0,35	n.s.	9,9	-0,52	n.s.	9,61	-2,28	<b>&lt; 0,05</b>
PARV-CeAl	9,05	0,34	n.s.	9,99	-0,49	n.s.	7,83	-0,90	n.s.	6,48	-1,79	n.s.
PARV-CeA	9,34	0,93	n.s.	7,71	0,13	n.s.	8,64	-2,87	<b>0,02</b>	8,42	-3,09	<b>0,01</b>

Tab.18. Ergebnisse der t-Tests zur Bestimmung von maternalen und genetischen Einflüssen auf die Anzahl PARV-immunpositiver Neurone in den Amygdalakerengebieten der Stämme C3H und DBA. Bestimmung von maternalen Einflüssen durch den Vergleich der Transfers von genetisch identischen Blastozysten in Rezipienten verschiedener Stämme (CC-CD und DD-DC) und von genetischen Einflüssen durch den Vergleich der Transfers von genetisch unterschiedlichen Blastozysten in Rezipienten des selben Stammes (CC-DC und DD-CD). df = Anzahl der Freiheitsgrade

CC-CD = Vergleich der Transfers von C3H-Blastozysten in C3H- und DBA-Rezipienten  
DD-DC = Vergleich der Transfers von DBA-Blastozysten in DBA- und C3H-Rezipienten  
CC-DC = Vergleich der Transfers von C3H- und DBA-Blastozysten in C3H-Rezipienten  
DD-CD = Vergleich der Transfers von DBA- und C3H-Blastozysten in DBA-Rezipienten

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

Name: Claudia Rose, geb. Wagner  
Geburtsdatum: 16.02.1974  
Geburtsort: Bamberg  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## **Bildungsweg**

Schulbildung: 1980-1984: Volksschule Burgwindheim  
1984-1990: Frankenlandschulheim Schloß Gaibach, Außenstelle Gerolzhofen  
1990-1993: Clavius-Gymnasium Bamberg  
Abschluß am 09.07.1993: Abitur/Allgemeine Hochschulreife  
Hochschulausbildung: 1993-1998: Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Berufstätigkeit: 1999-2001: Bürotätigkeit in der Firma meines Schwiegervaters  
Promotion: 2002-2004: Doktorarbeit am Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg;  
Anstellung bei Innomed e.V., Magdeburg  
Sonstiges: 1997: Anstellung als studentische Hilfskraft in der Klinischen Forschergruppe der Medizinischen Poliklinik Würzburg

Hof, den 29.11.2005