

**Validierung einer heimkäfigbasierten Verhaltenstestbatterie
zur evidenzbasierten Belastungseinschätzung bei jungen Mäusen**

von Maria Heike Reiber

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Validierung einer heimkäfigbasierten Verhaltenstestbatterie
zur evidenzbasierten Belastungseinschätzung bei jungen Mäusen

von Maria Heike Reiber

aus Reutlingen

München 2023

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Departement
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Shana M. Bergmann
Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner
Univ.-Prof. Dr. Anna May
Priv.-Doz. Dr. Dorothea Döring

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Verhaltensmuster junger Mäuse.....	3
1.1	Frühe postnatale Phase und Adoleszenz	3
1.2	Adulte Phase.....	5
1.3	Einfluss maternalen Verhaltens.....	7
1.4	Einfluss geschlechtsspezifischer Differenzierung.....	9
2.	Evidenzbasierte Belastungseinschätzung.....	10
2.1	Ethische Grundlagen	10
2.2	Rechtliche Grundlagen	12
2.3	Belastungseinschätzung genetisch veränderter Mauslinien	15
3.	<i>Scn1a</i>-A1783V-Modell	18
4.	<i>Gria1</i>-Modell.....	24
5.	Verhaltensuntersuchungen im Heimkäfig	28
5.1	Saccharinpräferenz	28
5.2	Wühl- und Nestbauverhalten.....	29
5.3	Lauf- und Heimkäfigaktivität.....	31
6.	Open-Field-Test.....	34
7.	Irwin-Score	35
8.	Fäkale Kortikosteronmetaboliten.....	35
9.	Fragestellung und Zielsetzung	37
III.	MATERIAL UND METHODEN	39
1.	Versuchstiere	39
1.1.	C57BL/6 Wildtyp-Mäuse.....	39
1.2	<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell	40
1.3	<i>Gria1</i> -Modell	43
2.	Studiendesign.....	46
2.1	C57BL/6 Wildtyp-Mäuse.....	46
2.2	<i>Scn1a</i> -A1783V- und <i>Gria1</i> -Modell	49

3.	Verhaltensuntersuchungen.....	51
3.1	Saccharinpräferenz	51
3.2	Nestbauverhalten	51
3.3	Wühlverhalten	52
3.4	Lauf- und Heimkäfigaktivität.....	53
3.5	Open-Field-Test	53
3.6	Irwin-Score.....	54
3.7	Wärmebildbasierte Wurfüberwachung	55
4.	Fäkale Kortikosteronmetaboliten.....	55
5.	Statistik.....	56
IV.	ERGEBNISSE	58
1.	C57BL/6 Wildtyp-Mäuse.....	58
2.	<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell	68
3.	<i>Gria1</i> -Modell.....	82
4.	Korrelations- und Hauptkomponentenanalysen.....	94
V.	DISKUSSION	106
1.	C57BL/6 Wildtyp-Mäuse.....	106
2.	<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell	114
3.	<i>Gria1</i> -Modell.....	122
4.	Limitationen, Schlussfolgerungen und Ausblick.....	127
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	130
VII.	SUMMARY.....	132
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	134
IX.	ANHANG	156
1.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	156
2.	Geräte	159
3.	Software	160
4.	Lösungen, Medikamente, Substanzen.....	161
5.	Modifizierter Irwin-Test.....	164
6.	Korrelationsanalysen: <i>r</i> - und <i>p</i> -Werte.....	168
7.	R-Skripte	180

X.	PUBLIKATIONSLISTE	185
XI.	DANKSAGUNG	186

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADS/ADHS	Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom/ Aufmerksamkeitsdefizithyperaktivitätssyndrom
ANOVA	Varianzanalyse
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
Bf3R	Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren
bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
cpm	Umdrehungen pro Minute
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextransulfat-Natrium
FCM	Fäkale Kortikosteronmetaboliten
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GG	Grundgesetz
ggf.	gegebenenfalls
ggrd.	geringgradig
h	Stunde
hgrd.	hochgradig
IBF	Interfakultäre biomedizinische Forschungseinrichtung
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie
IQR	Interquartilrange
kDa	Kilodalton
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
MESZ	Mitteleuropäische Sommerzeit
m	Meter
mg	Milligramm
mgrd.	mittelgradig
min	Minute

n	Stichprobenumfang
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
OF	Open-Field
p	p -Wert
P	Postnataler Tag
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
r	Korrelationskoeffizient
resp.	respektive
RFID	Radiofrequenzidentifikation
RL	Richtlinie
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
SEM	Standardfehler
SPF	Spezifisch-Pathogen-frei
SUDEP	Plötzlicher, unerwarteter Tod bei Epilepsiepatienten (<i>Sudden Unexpected Death in Epilepsy</i>)
VO	Verordnung
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutzversuchstierverordnung
vgl.	vergleiche
VWR	Lauftradaktivität (<i>Voluntary Wheel Running</i>)
WT	Wildtyp
3R	<i>Replace, Reduce, Refine</i>
°C	Grad Celsius

I. EINLEITUNG

In der biomedizinischen Forschung hat der Einsatz genetisch veränderter Mauslinien seit der vollständigen Sequenzierung des menschlichen und murinen Genoms (LANDER et al., 2001; WATERSTON et al., 2002) eine immer größere Bedeutung erlangt. Gezielte genetische Modifizierung und embryonale Manipulation ermöglichen die Etablierung genetisch veränderter Mauslinien (Bf3R, 2016), die als Modellorganismen bei der Erforschung von Krankheitsbildern des Menschen eine bedeutende Rolle spielen. Während die Zahl der insgesamt in Deutschland eingesetzten Versuchstiere (Wirbeltiere und Kopffüßler) seit 2015 rückläufig ist, steigt der Anteil genetisch veränderter Mäuse an der Gesamtversuchstierzahl stetig (EU, 2020; Bf3R, 2021). Im Jahr 2020 waren bereits knapp 50 % der bei Tierversuchen eingesetzten Mäuse genetisch verändert (Bf3R, 2021). In der neurowissenschaftlichen Forschung haben genetisch veränderte Modellorganismen eine große Bedeutung im Hinblick auf die Erforschung pathophysiologischer Mechanismen (CRYAN & HOLMES, 2005) und pharmakologischer Interventionsmöglichkeiten (DUGGER et al., 2018). Viele neuropsychiatrische Krankheiten haben eine entwicklungspathologische Komponente, sodass Schmerzen, Leiden und Schäden bei den Mäusen, die diese Krankheitsbilder genetisch modellieren, bereits im Laufe der Entwicklung der Tiere auftreten können (SUKOFF RIZZO & CRAWLEY, 2017). Daher ist es von besonderer Bedeutung, den Phänotyp dieser Tiere auch im Laufe ihrer Individualentwicklung zu charakterisieren, um so zum einen Informationen über die Validität des Tiermodells zu erhalten und zum anderen etwaige Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden, die die Tiere im Sinne der Richtlinie (RL) 2010/63/EU in dieser Zeit erfahren, adäquat erfassen zu können. Im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Verbundprojekts (DFG-FOR2591, 2022) wurde ein nationales Forschungskonsortium gegründet mit dem Ziel, modellspezifische Methoden zur evidenzbasierten Belastungseinstufung von Versuchstieren zu entwickeln und zu validieren (BLEICH & TOLBA, 2017). Der Fokus des Konsortiums liegt besonders auf der Entwicklung und Validierung von Methoden zur minimal- und nichtinvasiven Überwachung der Tiere, wofür auch der Einsatz von Bildgebungsverfahren unerlässlich ist (BLEICH & TOLBA, 2017; BLEICH et al., 2020). Validierte Methodiken zur Belastungseinschätzung von

Labornagern, die für den Einsatz in konventionellen Versuchstierhaltungen praktikabel sind, bilden die Grundlage, um Schmerzen, Leiden und Schäden, die Versuchstiere erfahren, sensitiv und graduell erfassen und diese im Sinne des *Refinements* minimieren zu können. Dabei sollten bei den Untersuchungen stets verschiedene Aspekte des Verhaltensrepertoires der Tiere miteinbezogen werden, um den multidimensionalen Charakter der Belastung adäquat abbilden zu können [vgl. (ABDELRAHMAN et al., 2019; KEUBLER et al., 2020; TALBOT et al., 2020; TANG et al., 2020; VAN DIJK et al., 2020)]. Heimkäfigbasierte Verhaltensuntersuchungen haben eine große Bedeutung sowohl als minimal-invasive und praktikable Methodik der Belastungseinschätzung (ZENTRICH et al., 2021) als auch hinsichtlich ihres breiteren Einsatzes in der präklinischen Forschung (BARAN et al., 2022). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher eine heimkäfigbasierte Testbatterie entwickelt und validiert werden, die Verhaltensveränderungen bei jungen Mäusen im Laufe der Entwicklung der Tiere abbilden kann. Auf der Basis der Ergebnisse sollten zudem Aussagen über die Augenscheinvalidität der eingesetzten Tiermodelle und die kumulative Belastung der genetisch veränderten Mauslinien getroffen werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Verhaltensmuster junger Mäuse

Genetische und epigenetische Faktoren sowie Einflüsse aus der belebten und unbelebten Umwelt reduzieren die phänotypische Plastizität eines Individuums graduell im Laufe seiner Entwicklung (BRUST et al., 2015). Ein hoher Grad genetischer Homogenität geht nicht mit einer Uniformität des Phänotyps einher: die Verringerung der phänotypischen Plastizität ist ein fortlaufender Prozess, der mit dem Durchschreiten wichtiger Entwicklungsabschnitte auch punktuell beeinflusst wird (BRUST et al., 2015). So stellen etwa die Geburt und die darauf folgenden Umwelteinflüsse, die Einleitung der sexuellen Differenzierung (BERTA et al., 1990) sowie das Einsetzen der Pubertät prägende Stationen auf dem Weg der Individualentwicklung dar (BRUST et al., 2015). Komplexe neurobiologische Umbauvorgänge im Laufe der Individualentwicklung können erhebliche Schwankungen der Verhaltens- und Reaktionsmuster von Säugetieren mit sich bringen (BRUST et al., 2015; PATTWELL et al., 2016; CASEY et al., 2019). Um spezifische Verhaltens- und Reaktionsmuster der Maus charakterisieren zu können, stellt die Einteilung der Individualentwicklung der Maus in verschiedene Entwicklungsstadien eine Grundvoraussetzung dar. Es existiert bis dato keine einheitliche Klassifizierung der Entwicklungs- und Lebensabschnitte der Labormaus (BRUST et al., 2015; DUTTA & SENGUPTA, 2016). Brust und Kollegen (2015) haben basierend auf einer umfassenden Literaturrecherche die Lebensphasen der Maus in verschiedene Entwicklungsabschnitte unterteilt. Einen Überblick über diese Klassifizierung zeigt Tabelle 1.

1.1 Frühe postnatale Phase und Adoleszenz

Die frühe postnatale Phase beginnt mit der Geburt der Jungtiere und endet mit dem Absetzen der Jungtiere vom Muttertier, das heißt, mit der Unabhängigkeit der Jungtiere vom Muttertier (LE ROY et al., 2001; BRUST et al., 2015). Mit dem Abschluss der Entwicklung der Innenohrstrukturen um den postnatalen Tag (P) 13 öffnen die Jungtiere auch die Augen, sodass mit P14 die Phase explorativen und investigativen Verhaltens beginnt (BRUST et al., 2015). Da die Jungtiere in dieser

frühen Entwicklungsphase noch nicht zwischen schädlichen und nicht schädlichen Einflüssen unterscheiden können, reagieren sie mit überschießender Reaktion auf externe Stimuli, was einen Schutzmechanismus des Beutetiers Maus darstellen kann (BRUST et al., 2015). Die Phase wird daher auch als *hoppy stage* oder *popcorn stage* bezeichnet (BRUST et al., 2015).

An die frühe postnatale Phase schließt sich mit dem Erreichen der Unabhängigkeit vom Muttertier für die jungen Mäuse eine Phase tiefgreifender neurobiologischer Veränderungen an, bei der es zu essentiellen Umbauvorgängen neuronaler Netzwerke, besonders der kortikalen und limbischen Bahnen, kommt (BRUST et al., 2015). Die in diesem Lebensabschnitt erfahrene Vielzahl neurobiologischer Veränderungen ermöglicht es den Tieren, sich in Richtung kognitiver, sozialer, emotionaler und sexueller Reife zu entwickeln (BRUST et al., 2015). Der Begriff der Adoleszenz ist nicht nur im Hinblick auf die Altersklassifizierung der Labormaus, sondern auch als Lebensabschnitt des Menschen uneinheitlich definiert: so kann die Adoleszenz des Menschen den Lebensabschnitt zwischen „Beginn oder Ende“ der Pubertät und dem Erwachsenenalter bezeichnen (PSCHYREMBEL ONLINE, 2022). Dabei ist die Adoleszenz des Menschen gekennzeichnet durch eine Persönlichkeitsfestigung (PSCHYREMBEL ONLINE, 2022).

Für die Adoleszenz ist zentral, dass eine Transformation vom infantilen zum erwachsenen Organismus stattfindet (BRUST et al., 2015). Diese geht mit hormonellen Veränderungen und Veränderungen im Verhaltensmuster der Tiere einher (BRUST et al., 2015). Bei der Labormaus kann diese Entwicklungsphase in die frühe Adoleszenz (P22-P34), die mittlere Adoleszenz (P35-P47) und die späte Adoleszenz (P48-P60) unterteilt werden. Die frühe Phase der Adoleszenz, die Präpubertät, wird bei der Labormaus mit dem Absetzen der Jungtiere vom Muttertier eingeleitet und ist gekennzeichnet durch den Beginn der sexuellen Reifung, die mit einem Anstieg des Wachstumshormonspiegels verbunden ist (BRUST et al., 2015). Weiter charakterisiert die Öffnung der Vagina respektive der Beginn der Spermatogenese die frühe Phase der Adoleszenz (BRUST et al., 2015). Im Verlauf der mittleren Phase der Adoleszenz, der Pubertät, erlangen die Tiere die sexuelle Reife, was mit einer erhöhten Pheromon- und Testosteronproduktion bei männlichen Tieren einhergeht (BRUST et al., 2015). In dieser Phase kann bei männlichen Tieren auch der Beginn innergeschlechtlicher sozialer

Auseinandersetzungen beobachtet werden (BRUST et al., 2015). Der Phase der Erlangung sexueller Reife folgt die letzte Phase der Adoleszenz, in der die Tiere auch reifes (adultes) Verhalten entwickeln (BRUST et al., 2015). Diese letzte Phase der Adoleszenz, in die die Tiere bereits mit erlangter sexueller Reife eintreten, wird im Folgenden als Phase der „sexuellen Reife“ bezeichnet. Sie ist durch Verhaltensveränderungen charakterisiert, die das Gruppengefüge und die soziale Interaktion der Tiere untereinander betreffen (BRUST et al., 2015). In dieser Phase beginnen Einzeltiere zum einen, von der Gruppe abzuwandern (BRUST et al., 2015). Zudem werden verstärkt geschlechtsspezifische soziale Verhaltensmuster gezeigt (BRUST et al., 2015). Erfahrungen, die die Tiere während des sensiblen Entwicklungsabschnitts der Adoleszenz machen, können sich auf eine Vielzahl adulter Verhaltensmuster auswirken (BRUST et al., 2015).

1.2 Adulte Phase

Die adulte Lebensphase ist durch eine Stabilität und Kontinuität von Verhaltensmustern gekennzeichnet (BRUST et al., 2015). Zudem kennzeichnet es erwachsene Tiere, dass sie Nachkommen zeugen und diese erfolgreich aufziehen können (BRUST et al., 2015). Der Übergang von der Phase der Adoleszenz zum Erwachsenenalter kann bei der Labormaus nicht durch eine klare zeitliche Trennlinie gekennzeichnet werden. Der Beginn der adulten Phase wird daher mit der Zeitspanne P55 bis P65 beschrieben (BRUST et al., 2015). Obgleich Untersuchungen zur Stabilität von Verhaltensmustern bei erwachsenen Mäusen rar sind, gibt es Hinweise, dass neben dem Geschlecht auch Faktoren wie der Stamm und der Grad der Inzucht Einfluss auf die Stabilisierung von Verhaltensmustern bei jungen Tieren haben (BRUST et al., 2015; ELTOKHI et al., 2020, 2021). Eine Untersuchung bei weiblichen Tieren des Inzuchtstamms C57BL/6N bestätigte die Stabilität lokomotorischer Aktivität an P85 und P120 (BRUST et al., 2015). Die Phase altersstabiler Verhaltensmuster, in der keine entwicklungsbedingten Verhaltensveränderungen mehr stattfinden, wird im Laufe der Lebensspanne der Tiere abgelöst von einer Phase, in der alterungsbedingte Veränderungen die Stabilität und Kontinuität der Verhaltensmuster beeinflussen. Die post-reproduktive Phase beendet definitionsgemäß den adulten Lebensabschnitt der Labormaus (BRUST et al., 2015).

Tabelle 1. Überblick über die Stadien der Individualentwicklung der Maus. Darstellung nach Brust V et al. Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Frontiers in Zoology* 2015; 12: S17. Die hervorgehobenen Altersphasen stellen die drei Entwicklungsphasen während der murinen Adoleszenz dar. Frühe Adoleszenz (Präpubertät), mittlere Adoleszenz (Pubertät), späte Adoleszenz (Sexuelle Reife). P = Postnataler Tag.

Altersphase	Altersspanne	Charakteristika
<i>Frühe postnatale Phase</i>	P0-P22	Öffnen der Ohren an P3. Öffnen der Augen an P11-P13. Popcorn-Phase an P15-P25 mit Plateau an P20. Ende mit dem Absetzen und Erlangung der Unabhängigkeit vom Muttertier an P21-P25.
<u>Präpubertät</u>	P22-P34	Beginn mit dem Absetzen. Beginn der sexuellen Reifung, Öffnung der Vagina (P26), Beginn der Spermatogenese (P21). Zunahme des Wachstumshormonspiegels.
<u>Pubertät</u>	P35-P47	Erreichen der sexuellen Reife (volle Fruchtbarkeit). Beginn der Pheromonproduktion bei männlichen Mäusen.
<u>Sexuelle Reife</u>	P48-P60	Sexuell reife Tiere beginnen von der Gruppe abzuwandern.
<i>Erwachsenenalter</i>	ab P60	P55-P65 kann als späte Adoleszenz oder als junges Erwachsenenalter angesehen werden. Voll entwickelter Körper. Voll entwickeltes Verhaltensrepertoire. Testosteronproduktion männlicher Mäuse erreicht den Spiegel erwachsener Mäuse, was den Eintritt ins Erwachsenenalter gemeinhin definiert. Phase altersstabiler Verhaltensmuster zwischen P85-P120.
<i>Beginn der post-reproduktiven Phase</i>	P570-P901	Stammspezifische Charakteristika.

1.3 Einfluss maternalen Verhaltens

Auch unter den optimierten Bedingungen einer Labortierhaltung ist die Fürsorge und Pflege durch das Muttertier für die Jungtiere in der postnatalen Phase überlebensnotwendig (WILLIAMS & SCOTT, 1954; WEBER & OLSSON, 2008). Das maternale Verhaltensrepertoire umfasst neben dem Säugen der Jungtiere die Stimulation der Verdauung durch Belecken sowie die allgemeine Stimulation durch Belecken, Putzen und Pflegen der Jungtiere (WEBER & OLSSON, 2008). Maternales Verhalten beginnt bereits in der frühen Trächtigkeit mit dem Bau des maternalen Nests (WEBER & OLSSON, 2008). Während der ersten drei Lebenswochen der Jungtiere nimmt das Säugen einen Großteil des maternalen Verhaltens ein und bis zum postnatalen Tag (P) 9 verbringt das Muttertier die meiste Zeit im Nest mit Körperkontakt zu den Jungtieren (WEBER & OLSSON, 2008). Das Verdauungssystem der Neonaten ist auf die Stimulation durch das Muttertier angewiesen (BRUST et al., 2015). Das Ausmaß der Pflege der Jungtiere durch das Muttertier erreicht seinen Höchststand um P8 (BRUST et al., 2015). Die Aufrechterhaltung maternalen Verhaltens wie Leckverhalten und der Wechsel der Säugeposition sind dabei von der Stimulierung des Muttertiers durch die Neonaten (Vokalisation im Ultraschallbereich) abhängig (ELWOOD & KEELING, 1982; EHRET & BERNECKER, 1986; WEBER & OLSSON, 2008; BRUST et al., 2015). Abweichungen im maternalen Verhalten, eine Vernachlässigung durch das Muttertier oder der Entzug maternaler Fürsorge etwa durch zu frühes Absetzen oder wiederholte Separation vom Muttertier können zu Langzeitfolgen bei den Jungtieren führen, die das Verhalten der Jungtiere lebenslang beeinflussen können (TSUDA et al., 2011; BRUST et al., 2015; GERECSEI et al., 2018). Maternales Verhalten beeinflusst epigenetische Regulationsmechanismen während der frühen postnatalen Entwicklung der Jungtiere und beeinflusst dadurch auch die Entwicklung der Jungtiere auf lange Sicht (SZYF et al., 2007; BRUST et al., 2015) – insbesondere auch die Genexpression im Hippocampus adulter Tiere (CHAMPAGNE & CURLEY, 2009). Ein wesentlicher Einflussfaktor maternalen Verhaltens stellt die Genetik dar (BRIDGES, 1998; WEBER & OLSSON, 2008). Als weitere Einflussgrößen auf das maternale Verhalten werden die Größe und Zusammensetzung des Wurfs sowie die Erfahrung des Muttertiers (erstgebärend versus multipar) genannt (WEBER & OLSSON, 2008). Es gibt Hinweise, dass diese Faktoren die Zeit beeinflussen, die das Muttertier im Nest bei der

Jungtieraufzucht verbringt (WEBER & OLSSON, 2008). Des Weiteren stellt Stress einen wesentlichen Faktor dar, der maternales Verhalten negativ beeinflussen kann (WEBER & OLSSON, 2008). Klassische Tests, um maternales Verhalten zu bewerten, sind die Analyse des maternalen Nestbauverhaltens (WEBER & OLSSON, 2008; GERECSEI et al., 2018) und der *Pup-Retrieval-Test* (PORTER, 1983; WEBER & OLSSON, 2008). Grundsätzlich wird beim Nestbauverhalten der Maus zwischen zwei Nestarten unterschieden: das Nest zur Jungtieraufzucht, das das weibliche Tier rund vier Tage nach der Verpaarung beginnt zu konstruieren, und das Nest zur Thermoregulation, das von weiblichen wie männlichen Mäusen konstruiert wird und den Tieren als Rückzugsort zum Schlafen dient (WEBER & OLSSON, 2008). Das Nest zur Jungtieraufzucht ist zwei bis drei Mal so groß wie das Schlafnest und rundum geschlossen mit ein bis zwei Eingängen (WEBER & OLSSON, 2008). Beim *Pup-Retrieval-Test* werden die Jungtiere eines laktierenden Muttertiers außerhalb des Nests platziert und die Zeit erfasst, innerhalb der das Muttertier das erste sowie alle außerhalb platzierten Jungtiere zurück ins Nest bringt (WEBER & OLSSON, 2008). Das Zurückziehen von außerhalb des Nests platzierten Jungtieren wird als charakteristisch für maternales Verhalten bewertet (PORTER, 1983; MEEK et al., 2001; WEBER & OLSSON, 2008). Ein weiterer häufig angewendeter Test zur Prüfung maternalen Verhaltens besteht darin, dem weiblichen oder männlichen Tier Jungtiere zu präsentieren, die bis zu sieben Tage alt sind, und die Reaktion des Tieres auf die präsentierten Jungtiere (Elemente parentaler Verhaltensweisen/Kannibalismus/neutrales Verhalten) zu bewerten (WEBER & OLSSON, 2008). Die vorgenannten Tests analysieren einzelne Aspekte des maternalen Verhaltensreportoires innerhalb eines relativ kurzen Zeitfensters und werden oft während der Hellphase – in der eigentlichen Ruhephase der Nager – durchgeführt (WEBER & OLSSON, 2008). Dadurch ist die Aussagekraft der Tests limitiert (WEBER & OLSSON, 2008). Zudem lassen Tests, die in einer für die Tiere unbekanntem Testumgebung durchgeführt werden, keine Aussagen über die Eignung des verwendeten Heimkäfigsystems und Enrichments zu (WEBER & OLSSON, 2008).

1.4 Einfluss geschlechtsspezifischer Differenzierung

Die sexuelle Differenzierung ist ein multifaktorieller und hoch komplexer Prozess in der Ontogenese von Säugetieren (THIBAUT, 2016). Die sexuelle Differenzierung der Geschlechtsorgane beginnt bereits im letzten Drittel der Trächtigkeit und spielt eine entscheidende Rolle für den Beginn der sexuellen Differenzierung des Gehirns (THIBAUT, 2016). Das Gehirn von Säugetieren entwickelt in der Abwesenheit von Geschlechtshormonen einen weiblichen Phänotyp (NUGENT et al., 2015; THIBAUT, 2016). Dabei spielen Androgenrezeptoren eine zentrale Rolle (THIBAUT, 2016). Zudem leiten plazentare zelluläre Mechanismen bereits entwicklungsneurologische Vorgänge der Geschlechtsdifferenzierung ein (BALE & EPPERSON, 2015; THIBAUT, 2016). Bei männlichen Säugetieren befinden sich Astrozyten und Mikroglia im Verlauf der Gehirnentwicklung in einem Zustand höherer Aktivierung (MCCARTHY, 2016). Mikroglia produzieren als Zellen des angeborenen Immunsystems in dieser Zeit mehr Prostaglandine und Entzündungsmediatoren bei männlichen Säugetieren (MCCARTHY, 2016). Astrozyten produzieren bei männlichen Tieren höhere Spiegel des exzitatorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) und die erhöhte Produktion findet über längere Zeit während der Entwicklung von männlichen Tieren statt (MCCARTHY, 2016). Des Weiteren sind epigenetische Modifikationen essentiell für die Ausprägung sexualspezifischer Verhaltensmuster (MATSUDA et al., 2012; NUGENT et al., 2015). Es gibt Hinweise, dass die pathophysiologischen Ursachen der geschlechtsspezifischen Inzidenz und Symptomatik vieler neuropsychiatrischer Erkrankungen eng mit der geschlechtsspezifischen Entwicklung des Gehirns verknüpft sind (RUTTER et al., 2003; BAO & SWAAB, 2010; THIBAUT, 2016; KACZKURKIN et al., 2019).

2. Evidenzbasierte Belastungseinschätzung

2.1 Ethische Grundlagen

Die Umsetzung ethischer Richtlinien in der biomedizinischen Forschung erfordert einen breiten gesellschaftlichen Konsens und sollte daher auf Grundlage dogmafreier Erklärungskonzepte erfolgen, die von einem Großteil der Bevölkerung geteilt werden (GROSS & TOLBA, 2015). Ein zentrales Element, das den Schutz der Versuchstiere begründet und auch in der Deutschen Gesetzgebung verankert ist, ist die Stellung des Tiers als „Mitgeschöpf“ in der Gesellschaft (§ 1, TierSchG, 2006¹). So wird in der Deutschen Gesetzgebung die Verantwortung des Menschen beschrieben, das Leben und Wohlbefinden von Tieren – unseren Mitgeschöpfen – zu schützen (§ 1, TierSchG, 2006¹). Eine Einigung auf ethische Grundpfeiler, für die ein Konsens auch auf breiter Ebene besteht, ermöglicht eine Implementierung dieser gemeinsamen Grundprinzipien in die Gesetzgebung, sodass staatenübergreifende Richtlinien erstellt werden können. In der Richtlinie (RL) 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere² wurde als ein solches zentrales Prinzip der Grundgedanke der 3R, begründet 1959 von William Russell und Rex Burch, verankert. Die Umsetzung dieser Richtlinie erfolgt durch die nationale Gesetzgebung der Mitgliedstaaten der Europäischen Union. Ähnlich der von Tom L. Beauchamp und James F. Childress 1979 in ihrem Werk „Principles of biomedical ethics“ begründeten vier Grundpfeiler für die Medizinethik, stellt das Prinzip der 3R (*replace, reduce, refine*) das zentrale ethische Prinzip der Versuchstierkunde dar (RUSSELL & BURCH, 1959; BEAUCHAMP, 1979; GROSS & TOLBA, 2015). Der Begriff *replace* bezeichnet die Substitution von Tierversuchen durch tierversuchsfreie Methoden. Der Begriff *reduce* zielt darauf ab, dass die Tierzahl minimiert wird bei ausreichender statistischer Power. Unter dem Oberbegriff *refine* werden alle Maßnahmen verstanden, die das Wohlbefinden der Versuchstiere verbessern und den Schaden, den die Tiere erleiden, minimieren (GROSS & TOLBA, 2015). Tatsächliches oder potenzielles Leid, negativer Stress (Disstress) sowie andere negative Effekte sollen

¹ § 1 Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 105 des Gesetzes vom 10. August 2021 (BGBl. I S. 3436) geändert worden ist

² Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, ABl. L 276 vom 20.10.2010, S.1-47

unter Einsatz geeigneter Methoden des *Refinements* ganz vermieden oder reduziert werden (GROSS & TOLBA, 2015). Im Hinblick auf die Einschätzung der kumulativen Belastung der Versuchstiere ist hervorzuheben, dass das Prinzip des *Refinements* unabhängig von der Versuchsdauer während der gesamten Lebensspanne der Tiere anzuwenden ist (GROSS & TOLBA, 2015). Somit gilt es, beim *Refinement* neben dem Studiendesign auch Faktoren wie Zucht, Haltungsbedingungen und Transport zu optimieren (GROSS & TOLBA, 2015). Ein weiterer wesentlicher Faktor ist der Einfluss des *Refinements* auf die Robustheit der Daten und somit auf die Validität der Forschungsergebnisse (BLEICH et al., 2020; BRILL et al., 2021). So sind Belastungseinschätzung und adäquates *Refinement* auf der einen Seite ethischer Imperativ und tragen auf der anderen Seite entscheidend zur Robustheit und Qualität präklinischer Daten bei, indem Auswirkungen auf Physiologie und Verhaltensweisen der Versuchstiere minimiert werden können (SMITH et al., 2018). Die Verzahnung von ethischer Verantwortung in der Versuchstierkunde und wissenschaftlicher Qualität wurde bereits von Russell und Burch 1959 beschrieben, die die Wahl des geeigneten Tiermodells und die Prüfung des Studiendesigns in einem eigenen Kapitel ihres Werks „The principles of humane experimental technique“ erläuterten. Es gibt immer wieder Bestrebungen, das klassische 3R-Prinzip mit einem vierten „R“ zu ergänzen. So kann ein viertes „R“, wie es die Indische Nationale Wissenschaftsakademie vorgeschlagen hat, für *Rehabilitation* stehen, was auf die Nachversorgung und/oder Wiederverwendung von Versuchstieren abstellt (MANDAL & PARIJA, 2013; GROSS & TOLBA, 2015). Die erneute Verwendung eines Versuchstiers ist jedoch gemäß der RL 2010/63/EU³ in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union mit hohen Hürden verbunden. Dahingegen hat die Max-Planck-Gesellschaft mit einem vierten „R“ den Begriff *Responsibility* eingeführt und verpflichtet sich in ihrer „Stellungnahme zu Tierversuchen in der Grundlagenforschung“ (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT, 2016) zur Umsetzung des vierten „R“'s. Das Sozialleben von Versuchstieren soll verbessert und die wissenschaftliche Grundlage für eine objektive Ermittlung von Empfindungsfähigkeit, Schmerzerfahrung, Bewusstsein und Intelligenz in der Tierwelt weiterentwickelt werden (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT, 2016). Zudem soll über die Einrichtung eines Ethik-Curriculums der öffentliche tierethische Diskurs professionell unterstützt werden

³ Artikel 16, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

(MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT, 2016). Patrick Bateson hat 1986 in seinem ethischen Grundsatzpapier Lösungsstrategien für das ethische Dilemma vorgestellt, in dem sich viele Wissenschaftler in der Versuchstierkunde befinden. Dieses Prinzip fußt auf dem Grundgedanken, dass der Wert der Forschung nach dem klassischen Schaden-Nutzen-Prinzip den Leidensgrad der Versuchstiere aufwiegen muss (BATESON, 1986). In seinem Grundsatzpapier formuliert Bateson (1986) auch die Grundsatzfrage „how do we measure suffering?“. Flecknell beschrieb daraufhin 1994 die unmittelbare, verlässliche Detektion und Einschätzung des Gesamtstatus des Tiers auf Basis der Analyse von Schmerzen und Disstress als Schlüsselement des *Refinements* (FLECKNELL, 1994). Mason und Mendl stellen jedoch 1993 schon klar, dass sich die Parameter, anhand derer die Belastung der Tiere eingeschätzt wird, im Individuum über die Lebenszeit verändern können. Es genügt daher nicht, bei der Bewertung der Schmerzen, Leiden und Schäden auf die Betrachtung einer oder einiger weniger Parameter abzustellen, jedoch kann die Betrachtung unterschiedlicher Parameter wiederum zu widersprüchlichen Ergebnissen führen (MASON & MENDEL, 1993; KEUBLER et al., 2020). Um diesem multidimensionalen Aspekt der Belastungseinschätzung und der subsequenten Implementierung einer adäquaten *Refinement*-Strategie gerecht zu werden, sollten speziesspezifische Parameter identifiziert und in verschiedenen Tiermodellen validiert werden (KEUBLER et al., 2020; VAN DIJK et al., 2020). Die Parameter sollten zusätzlich anhand von Korrelations-, Hauptkomponenten- oder Clusteranalysen auf ihre Robustheit geprüft werden (KEUBLER et al., 2020; VAN DIJK et al., 2020).

2.2 Rechtliche Grundlagen

Der Tierschutz ist seit dem Jahr 2002 im Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland als Staatsziel verankert (vgl. Art. 20a, GG, 1949⁴). In der RL 2010/63/EU, die am 1. Januar 2013 in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union in Kraft getreten ist und die Richtlinie 86/609/EEC abgelöst hat, wird eine prospektive Belastungseinschätzung im Rahmen des Antragstellungs-, Erlaubnis-

⁴ Art. 20a, Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland in der im Bundesgesetzblatt Teil III, Gliederungsnummer 100-1, veröffentlichten bereinigten Fassung, das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 28. Juni 2022 (BGBl. I S. 968) geändert worden ist

und Genehmigungsverfahren sowie eine Feststellung der tatsächlichen Belastung des einzelnen Tieres im Versuchsverlauf gefordert (SMITH et al., 2018). Die Umsetzung der RL 2010/63/EU erfolgt in Deutschland über die TierSchVersV in Verbindung mit dem TierSchG. Zur Belastungseinschätzung von Versuchstieren regelt die Richtlinie 2010/63/EU generell, dass „der Schweregrad eines Verfahrens (...) nach dem Ausmaß von Schmerzen, Leiden, Ängsten oder dauerhaften Schäden festgelegt (wird), die das einzelne Tier während des Verfahrens voraussichtlich empfindet bzw. erleidet“ (RL 2010/63/EU, Anhang 8⁵). Dabei ist die Definition des Begriffs „Verfahren“ zentral: so definiert die RL 2010/63/EU das Verfahren als „jede invasive oder nicht invasive Verwendung eines Tieres zu Versuchszwecken oder anderen wissenschaftlichen Zwecken mit bekanntem oder unbekanntem Ausgang, oder zu Ausbildungszwecken, die bei dem Tier Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden in einem Ausmaß verursachen kann, das dem eines Kanüleneinstichs gemäß guter tierärztlicher Praxis gleichkommt oder darüber hinausgeht“ (RL 2010/63/EU, Art. 3⁶). Unter den Begriff des Verfahrens fallen auch die Erschaffung oder Erhaltung genetisch veränderter Tierlinien (vgl. RL 2010/63/EU, Art. 3⁷). Grundsätzlich unterteilt die Richtlinie 2010/63/EU die phänotypische Belastung von Versuchstieren in vier Kategorien: Schweregrad 1 – geringe Belastung, Schweregrad 2 – mittlere Belastung und Schweregrad 3 – hohe Belastung sowie keine Wiederherstellung der Lebensfunktion (RL 2010/63/EU, Art. 15⁸). Als „gering“ – Schweregrad 1 – wird die Belastung eingestuft, wenn genetisch veränderte Tiere gezüchtet werden, bei denen ein Phänotyp mit nur geringen Auswirkungen oder kein klinisch nachweisbarer nachteiliger Phänotyp zu erwarten ist (RL 2010/63/EU, Anhang 8, Abschn. 1⁹). In den Schweregrad 2 wird „die Züchtung von genetisch veränderten Tieren, bei denen zu erwarten ist, dass sie nur zu einem Phänotyp mit mittelschweren Auswirkungen führen; sowie die Schaffung von genetisch veränderten Tieren durch chirurgische Verfahren“ klassifiziert (RL 2010/63/EU, Anhang 8, Abschn. 3¹⁰). Als „schwer“ wird die Belastung der Tiere eingestuft bei einer „Züchtung von Tieren mit genetischen Störungen, bei denen zu erwarten ist, dass sie zu schwerer und dauerhafter

⁵ Anhang 8, Abschnitt 3, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

⁶ Artikel 3, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

⁷ Artikel 3, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

⁸ Artikel 15, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

⁹ Anhang 8, Abschnitt 1, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

¹⁰ Anhang 8, Abschnitt 3, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

Beeinträchtigung des Allgemeinzustands führen, bspw. Huntington-Krankheit, Muskeldystrophie, Modelle für chronische wiederkehrende Nervenentzündung“ (RL 2010/63/EU, Anhang 8, Abschn. 3¹¹). Die RL 2010/63/EU erläutert einige Beispiele für die Zuordnung von Verfahrensarten zu den einzelnen Schweregraden (RL 2010/63/EU, Artikel 15 Abs. 1 i. V. m. Anhang 8, Abschn. 3¹²). RL 2010/63/EU gibt vor, dass Tierversuche, die voraussichtlich mit länger andauernden, nicht zu lindernden starken Schmerzen, schweren Leiden oder Ängsten einhergehen, aus ethischen Gründen untersagt werden sollten (vgl. RL 2010/63/EU, Erwägung 23¹³). Grundsätzlich gilt für die Belastungseinschätzung von Versuchstieren, dass diese prospektiv im Sinne einer Schaden-Nutzen-Abwägung und das gesamte erwartete Tierleid miteinbeziehend erfolgen muss (SMITH et al., 2018). Zudem muss eine tatsächliche Belastungseinschätzung des Einzeltiers im Verlauf des Versuchs erfolgen (SMITH et al., 2018). Zuletzt muss die Belastung retrospektiv beurteilt und der Behörde mitgeteilt werden (SMITH et al., 2018). Die RL 2010/63/EU betont explizit, dass auch „kumulatives Leiden während eines Verfahrens“ bei der Belastungseinschätzung von Versuchstieren zu berücksichtigen ist (vgl. RL 2010/63/EU, Anhang 8, Abschn. 2¹⁴). Dies wird in der RL 2010/63/EU vor allem im Zusammenhang mit der Wiederverwendung von Versuchstieren näher erläutert (RL 2010/63/EU, Artikel 16¹⁵). Wie bereits dargestellt, fallen die Erschaffung oder Erhaltung genetisch veränderter Tierlinien auch unter den zentralen Begriff des Verfahrens (RL 2010/63/EU, Art. 3¹⁶). Smith und Kollegen (2018) schlagen im Arbeitsgruppenpapier der FELASA vor, bei der Beurteilung der kumulativen Belastung eines Tiers alle Aspekte der Gesundheit, des Wohlbefindens und der Pflege der Tiere sowie den Einfluss aller versuchsbedingten Eingriffe während der gesamten Lebenszeit der Tiere zu berücksichtigen. Dies schließt somit neben den versuchs- und nicht versuchsassoziierten Haltungsbedingungen auch die Aufzuchtbedingungen der Tiere mit ein (SMITH et al., 2018). In Anhang 8 gibt die RL 2010/63/EU dem Leser Beispiele zur Durchführung der Belastungseinschätzung an die Hand, bei denen es sich jedoch um eine Mischung aus einzelnen Verfahren und komplexeren Modellen

¹¹ Anhang 8, Abschnitt 3, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

¹² Artikel 15 Abs. 1 i. V. m. Anhang 8, Abschnitt 3 der RL 2010/63/EU (Fn. 2)

¹³ Erwägung 23, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

¹⁴ Anhang 8, Abschnitt 2, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

¹⁵ Artikel 16, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

¹⁶ Artikel 3, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

handelt und die in ihrer Gesamtheit nicht ausreichend sind, um Informationslücken zu schließen und Missverständnisse zu vermeiden (SMITH et al., 2018).

2.3 Belastungseinschätzung genetisch veränderter Mauslinien

Genetisch veränderte Mauslinien werden unter dem Begriff „genetisch veränderte Tiere“ gemäß Artikel 3 der RL 2010/63/EU¹⁷ subsumiert, die als gentechnisch veränderte Tiere (transgen, *knockout* und andere Formen der gentechnischen Veränderung) sowie natürlich entstandene oder induzierte Mutanten definiert werden (Bf3R, 2016). Die gentechnische Veränderung bezieht sich hierbei auf Genloci und nicht auf das Gesamtgenom der Tiere, sodass herkömmliche In- und Auszuchtstämme nicht als genetisch veränderte Tiere klassifiziert werden (Bf3R, 2016). Die Erzeugung genetisch veränderter Tiere durch embryonale Manipulation, Bestrahlung und Behandlung mit mutagenen Substanzen unterliegt der Genehmigungspflicht (Bf3R, 2016). Für die Generierung genetisch veränderter Tiere durch Kreuzung besteht nur dann eine Genehmigungspflicht, wenn eine Belastung der Kreuzungsnachkommen zu erwarten ist (Bf3R, 2016). Als etabliert gilt eine neue genetisch veränderte Linie, wenn Tiere mit gewünschtem Genotyp auftreten und die Übertragung der genetischen Veränderung stabil erfolgt, wovon frühestens in der zweiten Zuchtgeneration ausgegangen werden kann (Bf3R, 2016). Zusätzlich muss an den Tieren eine „basale Belastungsbewertung“ (Bf3R, 2016) erfolgen. Bei einem genetisch veränderten Tier mit einem belastenden Phänotyp handelt es sich um ein Tier, welches als Konsequenz der genetischen Veränderung wahrscheinlich Schmerzen, Leiden oder Schäden erfährt, die einem Kanüleneinstich gemäß guter tierärztlicher Praxis entsprechen oder darüber hinaus gehen (Bf3R, 2016). Die Erschaffung oder Erhaltung genetisch veränderter Tierlinien als Verfahren im Sinne der RL 2010/63/EU wird als beendet definiert, wenn „an der Nachkommenschaft keine weiteren Beobachtungen mehr anzustellen sind oder nicht mehr erwartet wird, dass diese Schmerzen, Leiden oder Ängste empfindet oder dauerhafte Schäden erleidet, die denen eines Kanüleneinstichs gleichkommen oder darüber hinausgehen“ (RL 2010/63/EU, Art. 17¹⁸). In Umsetzung der RL 2010/63/EU gibt das Bf3R in seinem Konsensuspapier eine Empfehlung ab für die Belastungseinschätzung genetisch veränderter Mauslinien

¹⁷ Artikel 3, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

¹⁸ Artikel 17, RL 2010/63/EU (Fn. 2)

und stellt hierfür ein Formblatt zur praktischen Durchführung der Belastungseinschätzung zur Verfügung (Bf3R, 2016). Das Formblatt besteht aus einem Formular zur Beurteilung des neugeborenen Wurfs, einem Formular zur Beurteilung des Wurfs beim Absetzen sowie einem Formular zur Beurteilung des Einzeltiers. Die vom Bf3R im Rahmen des Konsensuspapiers empfohlenen Untersuchungskriterien sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Empfehlung des Bf3R sieht vor, dass für die Untersuchungen zur Belastungseinschätzung keine zusätzlich gezüchteten Tiere, sondern Tiere, die sich ohnehin in der Zucht befinden, herangezogen werden sollen (Bf3R, 2016). Hinsichtlich der Tierzahl der zu untersuchenden Mauslinie sollen mindestens 14 Individuen beiderlei Geschlechts aus unterschiedlichen Würfen (mindestens sieben männliche und sieben weibliche Tiere) herangezogen werden (Bf3R, 2016). Wenn der Phänotyp nur bei Tieren eines Geschlechts auftreten kann, ist es gemäß der Empfehlung des Bf3R ausreichend, mindestens sieben Tiere des betreffenden Geschlechts zu beurteilen (Bf3R, 2016). Hinsichtlich der Dauer und der Zeitpunkte der Untersuchungen ist im Konsensuspapier geregelt, dass diese generell von der Geburt bis zum Ausscheiden aus der Zucht bzw. bis zur weiteren experimentellen Verwendung erfolgen sollen (Bf3R, 2016): die erste Beurteilung erfolgt bei Neonaten in Form einer Beurteilung des ganzen Wurfs, spätestens mit dem ersten Umsetzen der Tiere (Bf3R, 2016). Die zweite Beurteilung erfolgt in Form einer Beurteilung des ganzen Wurfs mit dem Absetzen der Tiere vom Muttertier (Bf3R, 2016). Weitere Beurteilungen, nun in Form von Einzeltierbeurteilungen, erfolgen im Alter von zwei Monaten und dann jeweils im Abstand von drei Monaten (Bf3R, 2016). Das Bf3R empfiehlt in seinem Konsensuspapier, die vorgenannten Untersuchungsintervalle zu verkürzen, sofern bei einer der Untersuchungen oder zwischen zwei Untersuchungen Hinweise auf einen belastenden Phänotyp festgestellt werden (Bf3R, 2016). Bezüglich der Beurteilung der Belastung des Muttertiers und des maternalen Verhaltens empfiehlt das Bf3R in seiner Stellungnahme eine Inaugenscheinnahme des Muttertiers bei der Beurteilung des neugeborenen Wurfs sowie die Beurteilung der Pflege durch das Muttertier durch Inaugenscheinnahme der Neonaten bei der ersten Wurfbeurteilung (Bf3R, 2016). Basierend auf der Gesamtheit der Untersuchungsergebnisse wird von der zuständigen Behörde eine Abschlussbeurteilung der genetisch veränderten Zuchtlinie erstellt. Grundsätzlich wird dabei die Belastung genetisch veränderter Tiere in der TierSchVersV in Umsetzung der RL 2010/63/EU in die Schweregrade „keine“, „geringe“, „mittlere“ und „schwere“ Belastung eingeteilt. Die Feststellung

der Belastung einer Linie stellt eine Grundlage für die Entscheidung der Behörde dar, die über die Genehmigung, Auflagen und *Refinement*-Maßnahmen von Verfahren im Sinne der RL 2010/63/EU entscheidet.

Tabelle 2. Übersicht über die Zeitpunkte und Parameter, die bei der Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien gemäß Bf3R berücksichtigt werden. *Bei Auffälligkeiten, auch zwischen den einzelnen Untersuchungen, sollen die Untersuchungsintervalle verkürzt werden. Beim altersabhängigen Beginn einer Erkrankung sollen Untersuchungszeitpunkte zudem prospektiv festgelegt werden. Darstellung gemäß der Empfehlung Nr. 002/2016 des Nationalen Ausschusses (TierSchG) vom 9. September 2016.

	Erste Wurfbeurteilung	Zweite Wurfbeurteilung	Einzeltierbeurteilung
<i>Zeitpunkt</i>	Neonatal, spätestens mit dem ersten Umsetzen.	Beim Absetzen des Wurfs vom Muttertier.	Am 2 Monate alten Tier, dann im Abstand von 3 Monaten.
<i>Parameter</i>	Farbe. Aktivität. Größe, Entwicklung. Milk Spot. Pflege durch das Muttertier.	Körpergewicht. Auffälligkeiten: haarlose Stellen Kümmerer Bisswunden Mikrophthalmie Elefantenzähne Hydrozephalus Andere	Körpergewicht. Ernährungszustand. Körperhaltung. Verhalten und Motorik. Fell und Körperöffnungen. Reaktion auf <i>Handling</i> . Sonstiges: Tumoren Entzündungen der Haut Verletzungen Kannibalismus Lautäußerungen Rektumprolaps Anderes

3. *Scn1a*-A1783V-Modell

Beim *Scn1a*-A1783V Modell handelt es sich um ein genetisches *loss-of-function* Mausmodell, bei dem es aufgrund einer heterozygoten Mutation des *Scn1a*-Gens (*Scn1a*^{+/-}) zu einem Funktionsverlust der α -1-Untereinheit eines neuronalen Natriumkanals (Na_v1.1) kommt (KUO et al., 2019; RICOBARAZA et al., 2019). Spannungsabhängige neuronale Natriumkanäle bestehen aus einer 260 kDa großen α -Untereinheit sowie einer mit der α -Untereinheit assoziierten β -Untereinheit (YU et al., 2006). *SCN1A* liegt beim Menschen auf dem Chromosom 2q24.3 und kodiert für die S6 Transmembranregion der Domäne IV des neuronalen Natriumkanals Na_v1.1 (LOSSIN, 2009). Bei Na_v1.1 handelt es sich um den Prototyp spannungsabhängiger Natriumkanäle von Säugern (YU et al., 2006). Der komplette Funktionsverlust der α -1-Untereinheit in GABA-ergen Interneuronen des Hippocampus führt durch Reduktion des Natriumioneneinstroms zu Transmitterimbilanzen, die wiederum zu neuronaler Übererregbarkeit und epileptischen Anfällen führen (CATTERALL et al., 2010; OAKLEY et al., 2011; BRUNKLAUS & ZUBERI, 2014). Im *Scn1a*-A1783V-Modell liegt eine Missense-Mutation an der Nukleotidposition 1783 vor (LAYER et al., 2021). Elektrophysiologische Untersuchungen haben bestätigt, dass die heterozygote *Scn1a*-A1783V Missense-Mutation im *Scn1a*-A1783V-Mausmodell zu einer beeinträchtigten Funktion der Interneuronen führt, die eine *Scn1a*-Haploinsuffizienz modelliert (LAYER et al., 2021). Durch den Austausch der Base Cytosin durch die Base Thymin an Nukleotidposition 5348 kommt es zu einem Austausch der korrespondierende Base Alanin zu Valin an Position 1783 (CATTERALL et al., 2010; OAKLEY et al., 2011).

Für die Generierung der Tiere des *Scn1a*-A1783V-Modells wurden Mäuse der genetischen Hintergrundstämme C57BL/6J (50 %, väterliche Seite) und 129S1/J (50 %, mütterliche Seite) gekreuzt. Bei Mausmodellen mit heterozygoter *Scn1a*-Mutation kann der Phänotyp und die Mortalität in besonderem Maße vom Hintergrundstamm beeinflusst werden (YU et al., 2006; MILJANOVIC et al., 2021b). So berichteten Ricobaraza und Kollegen (2019) von einer Mortalität von 75 % im *Scn1a*-A1783V-Modell mit 100%igem C57BL/6 Hintergrund (MILJANOVIC et al., 2021b). Yu und Kollegen (2006) berichteten bei einem Mausmodell mit heterozygoter *Scn1a*-Mutation mit 100%igem 129S1/J Hintergrund von einer 10%igen Mortalität (YU et al., 2006; MILJANOVIC et al.,

2021b), jedoch wurde bei diesen *Scn1a*^{+/-} Tieren auch kein Verhaltensphänotyp mit Auftreten von epileptischen Anfällen beobachtet (YU et al., 2006). Hinsichtlich der Charakterisierung junger *Scn1a*^{+/-} Tiere haben Bahceci und Kollegen (2020) bereits Verhaltensveränderungen bei adoleszenten männlichen Mäusen des *Scn1a*^{tm1^{Kea}}-Modells mit 25 % C57BL/6 und 75 % 129S1 Hintergrund festgestellt. Die Mortalität wurde beim *Scn1a*^{tm1^{Kea}}-Modell mit 54 % angegeben (MILLER et al., 2014; MILJANOVIC et al., 2021b). Bei *Scn1a*^{+/-} Tieren des *Scn1a*-A1783V-Modells mit hybridem C57BL/6J:129S1/J Hintergrund, deren Verhaltensphänotyp von unserer Arbeitsgruppe bereits im adulten Alter charakterisiert wurde, wurde das Auftreten spontaner Anfälle an P16 beobachtet und eine Mortalität von 40 % festgestellt (MILJANOVIC et al., 2021b). Epileptische Anfälle waren durch Hyperthermie induzierbar (hyperthermieinduzierter Schwellenwert bei *Scn1a*-A1783V^{+/-} Tieren an P23: 39.4 °C) (MILJANOVIC et al., 2021b). Weibliche und männliche adulte *Scn1a*^{+/-} Tiere wiesen einen veränderten Verhaltensphänotyp auf: im Open-Field-Test zeigten adulte Tiere Hyperlokomotion, ein generell erhöhtes Aktivitätsniveau und vermindertes angstassoziiertes Verhalten (MILJANOVIC et al., 2021b). Untersuchungen im Heimkäfig deuteten auf eine verstärkte Ausprägung anhedonieassoziiierter Verhaltensweisen bei adulten *Scn1a*-A1783V^{+/-} Tieren hin (MILJANOVIC et al., 2021b). Gemäß der Abschlussbeurteilung wurde die Belastung des *Scn1a*-A1783V-Modells mit der verwendeten Linie B6(Cg)-*Scn1a*^{tm1.1Dsf}/J x 129S1/Sv-Hprt^{tm1(cre)Mnn}/J am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät, LMU München, als „mittel“ eingestuft.

Bei heterozygoten *loss-of-function* Mutationen des *SCN1A*-Gens handelt es sich in den meisten Fällen um *de-novo* Mutationen, die mit dem Dravet-Syndrom assoziiert sind (ZUBERI et al., 2011; BRUNKLAUS & ZUBERI, 2014). 70-80% der Patienten mit Dravet-Syndrom tragen eine heterozygote Mutation des *SCN1A*-Gens im Genom (DRAVET, 2011a). Bei Patienten mit Dravet-Symptom wurden über 1.000 Mutationsvarianten beschrieben, von denen der Großteil zu einer *SCN1A*-Haploinsuffizienz führt (HIGURASHI et al., 2021). Es ist beschrieben, dass die Vielschichtigkeit *SCN1A*-assoziiierter Symptomatik auch auf das Variantenreichtum der vorkommenden *SCN1A*-Mutationen bei Patienten mit Dravet-Syndrom zurückgeführt werden kann (HIGURASHI et al., 2021; LAYER et al., 2021). 50 bis 60 % der Patienten mit Dravet-Syndrom tragen trunkierende

Mutationen (*non-sense*-Varianten) des *SCN1A*-Gens, während bei 30 bis 40 % der Patienten Missense-Mutationen identifiziert wurden (ZUBERI et al., 2011; HIGURASHI et al., 2021) Eine Mutation des *SCN1A*-Gens aufgrund familiärer Prädisposition konnte bei 10 % der Patienten mit dem Symptomkomplex der Generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+) festgestellt werden (HIGURASHI et al., 2021).

Das Dravet-Syndrom ist eine pädiatrische, epileptische Enzephalopathie mit einer geschätzten weltweiten Prävalenz von 1 zu 16.000 bis 45.000 (BRUNKLAUS et al., 2012; KRUEGER & BERG, 2015; ISHII et al., 2017; HIGURASHI et al., 2021). Epileptische Enzephalopathien werden gemäß der Definition der *International League against Epilepsy* (ILAE) definiert als „Erkrankung des Gehirns, die durch die andauernde Prädisposition, nicht provozierte Anfälle zu entwickeln, sowie durch die neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen, die sich daraus ergeben, charakterisiert ist“ (FISHER et al., 2005). Hinsichtlich der klinischen Präsentation wurde definiert, dass eine Epilepsieerkrankung vorliegt, wenn entweder zwei nicht provozierte Anfälle auftreten, die mehr als 24 Stunden auseinander liegen, oder ein nicht provozierter Anfall auftritt, der mit der Wahrscheinlichkeit einhergeht, weitere Anfälle zu entwickeln, oder die Diagnose eines epileptischen Syndroms gestellt wird (FISHER et al., 2014). Im Positionspapier der ILAE werden epileptische Syndrome der Kategorie „Beginn bei Neonaten und Kleinkindern (< 2 Jahre)“ definiert als „ein charakteristisches Cluster klinischer Symptome und Merkmale aus dem EEG, die oft von spezifischen ätiologischen Befunden (strukturell, genetisch, metabolisch, immunologisch und infektiös) unterstützt werden“ (ZUBERI et al., 2022). Die Diagnose des epileptischen Syndroms bei Patienten mit Epilepsie ist individuell zu stellen, da prognostische Faktoren und Beeinträchtigungen durch die Therapie der Epilepsie häufig miteinzubeziehen sind (ZUBERI et al., 2022). Das Dravet-Syndrom wurde nach der Erstbeschreiberin Charlotte Dravet benannt (DRAVET, 2011b) und wurde 1978 als „Severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI)“ beschrieben (DRAVET, 1978). Der klinische Verlauf des Syndroms kann in drei Krankheitsstadien unterteilt werden: das „febrile Stadium“ oder „diagnostische Stadium“, das „katastrophale Stadium“ und das „Stabilisierungsstadium“ (DRAVET, 2011a). Eine Übersicht über diese Krankheitsstadien bietet Tabelle 3.

Klassischer Weise manifestiert sich das Dravet-Syndrom initial im Säuglingsalter vor Vollendung des ersten Lebensjahres, in der Regel zwischen dem 5. und 8. Lebensmonat (DRAVET, 2011a; AKIYAMA et al., 2012). Charakteristisch für das diagnostische Stadium sind temperatursensitive Anfälle (DRAVET, 2011a). Das initiale Anfallsgeschehen bei Säuglingen steht häufig im Zusammenhang mit Fieber, kann aber auch durch andere thermale Stimuli wie ein heißes Bad ausgelöst werden (DRAVET, 2000). Zudem gibt es Hinweise, dass in über 50 % der Säuglinge die erste klinische Manifestation im Zusammenhang mit einer Impfung steht (TRO-BAUMANN et al., 2011). Vor dem Hintergrund, dass Fiebervermittelte Krampfanfälle bei 2-14 % aller Kinder im Laufe der Entwicklung auftreten, handelt es sich bei der initialen Präsentation um ein unspezifisches klinisches Bild (HATTORI et al., 2008).

Tabelle 3. Übersicht über die Krankheitsstadien des Dravet-Syndroms im Verlauf der Entwicklung. Darstellung nach Dravet C. The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia* 2011a; 52 Suppl 2: 3-9.

<i>Krankheitsstadium</i>	<i>Alter der Patienten</i>	<i>Charakteristika des Stadiums</i>
<i>Febriles oder diagnostisches Stadium</i>	< 1 Jahr	Temperatursensitive Anfälle. Oft klonische, unilaterale Anfälle.
<i>Katastrophales Stadium</i>	1-5 Jahre	Hochfrequentes Anfalls- und Statusgeschehen. Verhaltensverschlechterung. Neurologische Symptome.
<i>Stabilisierungsstadium</i>	> 5 Jahre	Abnahme der Anfallsaktivität. Anfälle treten häufig nachts auf. Myoklonische Anfälle und Absencen können verschwinden. Fokale Anfälle persistieren oder nehmen ab. Psychische Entwicklung und Verhaltensbeeinträchtigungen verbessern sich meist.

Obwohl die Stellung der Diagnose beim Dravet-Syndrom anhand der klinischen Symptomatik erfolgt, kann ein genetischer Screening-Test, anwendbar beim Säugling, zu einer früheren Diagnosestellung, insbesondere beim Auftreten temperatursensitiver Krampfanfälle, beitragen (DRAVET, 2011a). Das initial temperatursensitive Anfallsgeschehen ist progressiv und mit dem Fortschreiten des

Syndroms entwickeln die betroffenen Kinder spontane und schwerere Anfälle, was den Übergang in das katastrophale Stadium des Syndroms kennzeichnet (DRAVET, 2011a). In diesem Stadium können verschiedene Anfallstypen diagnostiziert werden: generalisierte klonische Anfälle, generalisierte tonisch-klonische Anfälle und alternierende unilaterale klonische Anfälle sowie myoklonische Anfälle (DRAVET, 2011a). Weiter sind atypische Absenzen, komatöser Status, fokale Anfälle mit oder ohne sekundäre Generalisation sowie sehr selten tonische Anfälle beschrieben (DRAVET, 2011a).

Nach Vollendung des fünften Lebensjahres folgt klassischer Weise das Stabilisierungsstadium, in dem die Anfallsfrequenz und die Anfallsschwere abnehmen (DRAVET, 2011a). Allerdings ist eine Verschlechterung der Epilepsie und der Entwicklungsbeeinträchtigungen auch nach dem 5. Lebensjahr möglich (DRAVET, 2011a). Im Verlauf der Krankheit wird das Anfallsgeschehen bei Patienten auch von Komorbiditäten begleitet, die mit einer Entwicklungsbeeinträchtigung einhergehen, die sich bei den betroffenen Kindern meist im Vorschulalter manifestiert (DRAVET, 2011a; VERHEYEN et al., 2021). Wie eine großangelegte multinationale Kohortenstudie über die Lebensqualität von Patienten mit Dravet-Syndrom und deren Angehörigen beschreibt, wurden von den Angehörigen und Pflegenden Lernschwierigkeiten am häufigsten genannt, gefolgt von motorischen Defiziten und Sprachschwierigkeiten (LAGAE et al., 2018). Auch Erkrankungen des Autismus-Spektrums, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) sowie Verhaltensprobleme anderer Genese (nicht-ADHS-assoziiert) wurden häufig diagnostiziert (LAGAE et al., 2018). Eine weitere große Kohortenstudie (VILLAS et al., 2017), die in der US-amerikanischen Bevölkerung durchgeführt wurde, beschreibt, dass in 97 % der Fälle über Schlafstörungen der Patienten berichtet wurde. Beide Studien berichten von einer Altersabhängigkeit erfragter Begleiterkrankungen der Patienten (VILLAS et al., 2017; LAGAE et al., 2018). Im Vergleich zu anderen pädiatrischen Epilepsien haben Patienten mit Dravet-Syndrom ein um den Faktor 15 erhöhtes Risiko für einen plötzlichen unerwarteten Tod (kurz: SUDEP) (KALUME et al., 2013). Der pathophysiologische Mechanismus des SUDEP wird kontrovers diskutiert, wobei Herzversagen und Atemstillstand als zugrunde liegende Ursachen diskutiert werden (MASSEY et al., 2014). Es gibt Hinweise, dass dem Pathomechanismus des SUDEP bei Patienten mit Dravet-Syndrom eine Dysregulation des autonomen

Nervensystems in Verbindung mit einem Funktionsverlust des Natriumkanals $Na_v1.1$ zugrunde liegt. So kann eine erhöhte Aktivität des Parasympathikus, die Kalume und Kollegen (2013) zu Beginn und am Ende der Anfälle in der tonischen Phase feststellten, eine Bradykardie mit nachfolgendem Funktionsverlust der Ventrikel bedingen. Kuo und Kollegen (2019) beschreiben einen spezifischen Zusammenhang der *Scn1a*-A1783V-Mutation mit der auftretenden Hypoventilation und Apnoe. In bis zu 60 % der Todesfälle von Patienten mit Dravet-Syndrom wird SUDEP als Ursache diagnostiziert (KALUME, 2013) und ist damit ein wesentlicher Faktor, der zur hohen Mortalität des Dravet-Syndroms beiträgt. Die Mortalität beim Dravet-Syndrom wurde von Charlotte Dravet und Kollegen 1992 mit 16 % beschrieben, wobei das mittlere Todesalter der Patienten in verschiedenen Studien zwischen fünf und zwölf Jahren liegt (GENTON et al., 2011).

Beim Dravet-Syndrom handelt es sich um eine therapierefraktäre Epilepsie, die ein multimodales Therapieregime erfordert (WALLACE et al., 2016). Das Ziel der Therapie besteht in der Reduktion der Anfallsfrequenz und Verbesserung der Lebensqualität der Patienten, da eine Anfallsfreiheit in der Regel nicht erreicht werden kann (WALLACE et al., 2016). Vielversprechende neue Ansätze für das therapeutische Management des Dravet-Syndroms bietet die Präzisionsmedizin (WALLACE et al., 2016; DUGGER et al., 2018), im Besonderen der Bereich der Gentherapie (HIGURASHI et al., 2021). Dabei stellt die frühzeitige Diagnose eine Grundvoraussetzung dar, um eine frühzeitige, individuelle, zielstrukturspezifische Behandlung der Patienten zu ermöglichen (WALLACE et al., 2016; DUGGER et al., 2018).

4. *Gria1*-Modell

Beim *Gria1*-Modell handelt es sich um ein genetisches *loss-of-function* Mausmodell, bei dem es aufgrund einer homozygoten Mutation des *Gria1*-Gens zu einem Funktionsverlust der Untereinheit 1 des L- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat (AMPA) Glutamatrezeptors (GluA1) kommt (ZAMANILLO et al., 1999). L-Glutamat ist der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (BROSNAN & BROSNAN, 2013). Die von der Aminosäure Glutamat abgeleitete γ -Aminobuttersäure (GABA) stellt den bedeutendsten inhibitorischen Neurotransmitter des zentralen Nervensystems dar (BROSNAN & BROSNAN, 2013). An der Regulation glutamaterger Neurotransmission sind ionotrope Rezeptoren (AMPA-, NMDA- (N-methyl-D-aspartate), Kainat-Rezeptoren) sowie metabotrope Rezeptoren (mGluR) beteiligt (BARKUS et al., 2012). AMPA-Rezeptoren bestehen aus den vier je rund 100 kDa großen Untereinheiten GluA1 bis GluA4, die von den Genen *GRIA1* bis *GRIA4* kodiert werden (CHATER & GODA, 2014). AMPA-Rezeptoren haben eine Schlüsselrolle inne bei der Modulation synaptischer struktureller und funktioneller Plastizität (SPRENGEL et al., 1998; HAYASHI et al., 2000; SHI et al., 2001; MALINOW & MALENKA, 2002; KOPEC et al., 2007; LEE et al., 2010; HUGANIR & NICOLL, 2013; CHATER & GODA, 2014).

Bei GluA1-defizienten Mäusen wurde eine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität festgestellt (ZAMANILLO et al., 1999). Des Weiteren zeigten Untersuchungen bei GluA1-defizienten Mäusen Beeinträchtigungen des räumlichen Arbeitsgedächtnisses (ZAMANILLO et al., 1999; REISEL et al., 2002; SCHMITT et al., 2003; BANNERMAN et al., 2004), stimuliinduzierte Übererregbarkeit (WIEDHOLZ et al., 2008) und Hyperlokomotion (VEKOVISCHEVA et al., 2001; SCHMITT et al., 2003; WIEDHOLZ et al., 2008). Weiter wurden bei GluA1-defizienten Mäusen Limitationen des Wühlverhaltens (BANNERMAN et al., 2004) sowie depressionsassoziierte Verhaltensveränderungen festgestellt (CHOURBAJI et al., 2008; AUSTEN et al., 2017). Interessanter Weise konnten bei einem Mausmodell, in dem die Ausschaltung des GluA1-Rezeptors in glutamatergen Neuronen des Vorderhirns erst in der Spätadoleszenz erfolgte, keine depressions- oder angstassoziierten Verhaltensveränderungen (Vogt et al., 2014) sowie keine Veränderungen des Sozialverhaltens (Inta et al., 2014) festgestellt werden. Dies kann darauf hindeuten,

dass pathophysiologische Veränderungen im Zusammenhang mit der GluA1-Defizienz im *Gria1-knockout*-Mausmodell bereits vor dem Eintritt der Tiere ins Erwachsenenalter stattfinden (VOGT et al., 2014).

Es gibt Hinweise, dass *Gria1*^{-/-} Mäuse Beeinträchtigungen bei Prozessen der Informationsverarbeitung aufweisen, so etwa bei der Anpassung an neue Stimuli, auf die sie mit einer erhöhten Aufmerksamkeit über eine längere Zeit reagieren (SANDERSON et al., 2010; BARKUS et al., 2012). Es ist bereits beschrieben, dass *Gria1*^{-/-} Mäuse eine normale Entwicklung durchlaufen und eine normale Lebenserwartung haben (BARKUS et al., 2012). Es ist zudem beschrieben, dass *Gria1*^{-/-} Mäuse keine Veränderungen der Feinstruktur von Dendriten und Synapsen aufweisen (BARKUS et al., 2012). Die Ausschaltung von *Gria1* bewirkt jedoch eine deutliche Reduktion der Anzahl der AMPA-Rezeptoren sowie eine reduzierte AMPA-Rezeptor-medierte synaptische Stromstärke bei adulten und jungen Mäusen (ANDRÁSFALVY et al., 2003; JENSEN et al., 2003; BARKUS et al., 2012). Es gibt Evidenz dafür, dass die phänotypischen Veränderungen, die bei adulten *Gria1*^{-/-} Mäusen festgestellt wurden, Aspekte der Negativsymptome von Patienten mit Schizophrenie modellieren können (WIEDHOLZ et al., 2008; FITZGERALD et al., 2010; BEN ABDALLAH et al., 2011; BARKUS et al., 2012; BARKUS et al., 2014).

Gemäß der Abschlussbeurteilung wurde das *Gria1*-Modell mit der verwendeten Linie B6N.129-*Gria1*^{tmIRsp/J} am IBF Heidelberg, Universität Heidelberg, als nicht belastet bzw. mit dem Vermerk „keine Belastung“ eingestuft.

GRIA1 wurde im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien als Kandidatengen der Schizophrenie detektiert (RIPKE et al., 2013; SCHIZOPHRENIA WORKING GROUP, 2014). Im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) wurden über 100 Risiko-Genloci für Schizophrenie identifiziert (FALKAI & HASAN, 2019). Die genetische Komponente der Schizophrenie beläuft sich auf 64-81 % (RUJESCU, 2019). Die Schizophrenie stellt eine komplexe Erkrankung des zentralen Nervensystems dar, bei der genetische und umweltbedingte Risikofaktoren interagieren (FALKAI & HASAN, 2019). Mit der hohen Heritabilität, die in Zwillingsstudien mit 80 % bezeichnet wurde, sind auch Umweltfaktoren (Gen-Umwelt-Interaktion) und epigenetische Faktoren assoziiert (VAN OS & KAPUR, 2009). Die Schizophrenie oder schizophrene Psychose bezeichnet eine „Gruppe schwerer psychischer Störungen mit im Vordergrund

stehender Positivsymptomatik wie Wahn, Halluzinationen oder Ich-Störungen, teilweise auch Störungen der Affektivität, Psychomotorik, des Antriebs und sozialen Verhaltens aber ohne Beeinträchtigung von Vigilanz und Orientierung“ (PSCHYREMBEL ONLINE, 2022). Der Begriff Schizophrenie wurde von Eugen Bleuler eingeführt und bedeutet „Spaltungsirresein“ (FALKAI & HASAN, 2019). Damit wird die Aufspaltung integrierter psychischer Funktionen wie Denken, Fühlen und Wollen beschrieben (FALKAI & HASAN, 2019). Die Schizophrenie gehört zur Gruppe funktioneller Psychosen (FALKAI & HASAN, 2019). Diese Gruppe wurde bereits 1899 von Emil Kraepelin als „Dementia praecox“ benannt und bezeichnete Erkrankungen, die im frühen Erwachsenenalter begannen und durch kognitive Defizite und eine schlechte Langzeitprognose gekennzeichnet waren (FALKAI & HASAN, 2019). Neuere Beschreibungen teilen die klinische Symptomatik in Positivsymptome, affektive Symptome und Negativsymptome ein (FALKAI & HASAN, 2019). Zu den Positivsymptomen zählen formale Denkstörungen (positiv/negativ/subjektiv/objektiv), Ich-Störungen, Wahn, Halluzinationen und katatone Symptome (FALKAI & HASAN, 2019). Als Katatonie wird ein psychomotorisches Syndrom aus einer Kombination motorischer, sprachlicher und affektiver Symptome bezeichnet (FALKAI & HASAN, 2019). Zu den affektiven Symptomen, die die Wahrnehmung und die Intensität des Erlebens von Emotionen beschreiben, zählen Affektverflachung, Ambivalenz und depressive Verstimmung (FALKAI & HASAN, 2019). Negativsymptome umfassen die Affektverflachung sowie Anhedonie, sozialen Rückzug, Amotivation und Alogie (FALKAI & HASAN, 2019). Patienten mit *early-onset*-Schizophrenie leiden unter einer stärker ausgeprägten Negativsymptomatik (FALKAI & HASAN, 2019). Patienten, bei denen eine schizophrene Psychose bereits vor dem 13. Lebensjahr diagnostiziert wurde (*very early-onset*), haben zudem eine schlechte Prognose (REMSCHMIDT & THEISEN, 2012). Patienten mit Schizophrenie leiden häufig an kognitiven Störungen, im Besonderen Störungen bei Prozessen der Informationsverarbeitung, die zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen im Alltags- und Berufsleben der Patienten führen können (RODEWALD, 2010). In Deutschland gibt es rund 800.000 schizophrene Erkrankte (RUJESCU, 2019). Die Inzidenz der Schizophrenie wird für Europa und die USA mit rund 1 % angegeben, was die Schizophrenie zu einer Krankheit von großer volkswirtschaftlicher Bedeutung macht (MCCUTCHEON et al., 2020). Die Pfeiler des Therapiemanagements der Schizophrenie stellen die

Psychotherapie, somatische Therapien, Neurostimulation und psychosoziale Therapien dar (FALKAI & HASAN, 2019). In der Psychopharmakotherapie werden vor allem Antipsychotika eingesetzt, die über eine Blockade des dopaminergen Systems wirken (FALKAI & HASAN, 2019). Diese werden erfolgreich zur Behandlung der Positivsymptomatik eingesetzt, sind jedoch auch mit einem ungünstigen Nebenwirkungsprofil hinsichtlich unerwünschter motorischer und metabolischer Wirkungen verbunden (FALKAI & HASAN, 2019). Aus ätiologischer Sicht haben neben der Dopamin-Hypothese auch die Glutamat-Hypothese sowie die Interaktion beider Systeme eine große Bedeutung bei der pathophysiologischen Ursachenforschung (HOWES et al., 2015; FALKAI & HASAN, 2019): basierend auf der Glutamat-Hypothese gibt es Evidenz dafür, dass die Schizophrenie mit einer neurologischen Entwicklungsstörung einhergehen kann (LANG et al., 2007; RUND, 2018; EGERTON et al., 2020). Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten, die über eine Modulation des glutamatergen Systems wirken, bieten vielversprechende neue Therapieansätze im Sinne eines multimodalen Therapieregimes (HOWES et al., 2015; YANG & TSAI, 2017; FALKAI & HASAN, 2019).

5. Verhaltensuntersuchungen im Heimkäfig

Verhaltensuntersuchungen, die in der vertrauten Umgebung der Tiere durchgeführt werden können, haben den großen Vorteil, dass sie die Aktivität der Tiere durchgängig, während Hell- und Dunkelphase, abbilden können (PERNOLD et al., 2019). Diese nichtinvasive und weitestgehend untersucherunabhängige Überwachung bildet so auch spontane Aktivitäten der Tiere ab, die die Maus als Beutetier in Anwesenheit eines Untersuchers oder in einer neuen Umgebung nicht zeigen würde (VOIKAR & GABURRO, 2020). Äußere Einflussfaktoren wie *Handling* durch den Untersucher oder die für das Tier neue Situation eines experimentellen Set-ups können an sich bereits Disstress und damit assoziierte Verhaltensveränderungen bei den nachtaktiven Labornagern bewirken (TECOTT & NESTLER, 2004; TAPPE-THEODOR et al., 2019). Aufgrund der geringen Invasivität, der praktikablen Umsetzung in konventionellen Labortierhaltungen sowie der Möglichkeit der Detektion subtiler Verhaltensweisen sollten Heimkäfigbasierte Untersuchungen auch wichtiger Bestandteil der Belastungseinschätzung von Labornagern sein (ZENTRICH et al., 2021). Neben der Praktikabilität in konventionellen Labortierhaltungen ermöglicht die Anwendung Heimkäfigbasierter Untersuchungen, die unter den standardisierten Haltungsbedingungen einer konventionellen Labortierhaltung durchgeführt werden, eine höhere Datenqualität im Sinne von Reproduzierbarkeit und Validität zwischen verschiedenen Tierhaltungen (PERCIE DU SERT et al., 2020). Heimkäfigbasierte Untersuchungen bieten zudem, insbesondere wenn Verhaltensprofile automatisiert erstellt werden können, vielversprechende Einsatzmöglichkeiten bei den tierexperimentellen Phasen von Wirkstoffentwicklung und -prüfung (BARAN et al., 2022).

5.1 Saccharinpräferenz

Beim Nagernmodell stellt die Untersuchung der Präferenz des Tiers für eine frei zugängliche süße Lösung einen Verhaltenstest von hoher Praktikabilität dar, um Verhaltenszüge, die mit Depression (CRAWLEY, 2006) und Schmerz (DE LA PUENTE et al., 2015) assoziiert sind, zu erfassen. Anhedonie bezeichnet die eingeschränkte oder fehlende Fähigkeit, Freude oder Lust zu empfinden sowie eine verminderte Genussfähigkeit (PSCHYREMBEL ONLINE, 2022). Anhedonie kann als zentrales Symptom der Depression beschrieben werden (KLEIN et al., 2015). Der Saccharinpräferenztest wurde bei chronischen Epilepsiemodellen in Ratten und

Mäusen bereits für seinen Einsatz zur Belastungseinschätzung der Modelle validiert (KOSKA et al., 2019; MÖLLER et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019; BOLDT et al., 2021; BUCHECKER et al., 2022).

Hinsichtlich einer Altersabhängigkeit der Süßpräferenz beim Menschen wurde die Präferenz für Süßes bei Heranwachsenden vor Erreichen der Pubertät im Vergleich zu Probanden im erwachsenen Alter als erhöht beschrieben (VENDITTI et al., 2020). Bei Labornagern zeichnen Daten zur Altersabhängigkeit der Süßpräferenz ein nicht einheitliches Bild. So zeigten 31 bis 69 Monate alte Kaninchen eine höhere Präferenz für Süßes als die jüngeren, dreimonatigen Tiere (DRESHFIELD & BERRY, 1994). Eine weitere Studie, in der die Präferenz für Süße bei jungen Mäusen untersucht wurde, detektierte stammspezifische, aber keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der Saccharosepräferenz von präpubertären (P22-P26) und pubertären/postpubertären (P32-P36) Tieren (ELTOKHI et al., 2021).

5.2 Wühl- und Nestbauverhalten

Das Wühlverhalten stellt beim Labornager ein angeborenes, evolutionär konserviertes Verhalten dar (DEACON, 2006b, 2009). Weibliche und männliche Labormäuse zeigen eine hohe intrinsische Motivation für die Wühlaktivität (SHERWIN et al., 2004). Obgleich Geschlechtsunterschiede bei verschiedenen Labornagerspezies beschrieben wurden, sind diese beim Wühlverhalten der Labormaus gering ausgeprägt (DEACON, 2009). Es ist beschrieben, dass das angebotene Substrat einen bedeutenden Einfluss auf das Wühlverhalten von Labornagern hat (DEACON, 2009). Das Wühlverhalten wird in der Literatur zum einen als „nicht essentielles“ Verhalten der Maus beschrieben (DEACON, 2006b). Zum anderen wurde die Befriedigung dieses Bedürfnisses für verschiedene Nagerspezies als zwingend und unerlässlich beschrieben (SHERWIN et al., 2004; POND et al., 2021). In chronischen Tiermodellen beim Labornager wurde die Analyse des Wühlverhaltens erfolgreich als Methodik zur Erfassung von entzündungsvermitteltem Schmerz validiert und bei der Modifizierung des analgetischen Managements eingesetzt (ANDREWS et al., 2012; RUTTEN et al., 2014; WODARSKI et al., 2016). Die Analyse des Wühlverhaltens wurde zudem als „sensitiver positiver Indikator“ für das Wohlbefinden von Labornagern (JIRKOF, 2014) validiert. Beim Nager erfolgte die Validierung sowohl in chronischen Schmerzmodellen als auch in Modellen psychiatrischer und

neurologischer Erkrankungen (AUBERT, 1999; DEACON et al., 2008; DEACON, 2009; JIRKOF, 2014). Es gibt bis dato nur eine limitierte Anzahl an Studien, in denen über das Wühlverhalten junger Mäuse berichtet wurde. Es gibt jedoch erste Evidenz dafür, dass Labormäuse Wühlaktivität in relevantem und messbarem Ausmaß bereits während der Adoleszenz zeigen (HART et al., 2012; MCLINDEN et al., 2012; ELTOKHI et al., 2020).

Ähnlich dem Wühlverhalten ist nichtmaternales Nestbauverhalten beim Labornager integraler Bestandteil des natürlichen Verhaltensrepertoires weiblicher und männlicher Labornager. Es wird als „nicht essentielles“ Verhalten beschrieben, für das die Tiere eine hohe intrinsische Motivation zeigen (DEACON, 2006a). Die Nestbauaktivität kann in Analogie zum Wühlverhalten als „positiver Indikator“ (JIRKOF, 2014) eingesetzt werden, um Aussagen über das Wohlbefinden von Labormäusen zu treffen, da bei einer Beeinträchtigung des Wohlbefindens „nicht essentielle“ Aktivitäten von den Tieren als erstes eingestellt werden (JIRKOF et al., 2013b; JIRKOF, 2014; NEELY et al., 2019). Die Konstruktion des Nests aus dem Nestmaterial erfordert eine komplexe Interaktion verschiedener Verhaltensweisen wie Ziehen, Tragen, Zerkleinern und Graben, und setzt somit eine gerichtete Aktivität, Konzentration und Ausdauer voraus (GASKILL et al., 2012; JIRKOF, 2014). Die Analyse des Nestbauverhaltens wurde zudem als Verhaltenstest bei der Maus beschrieben, um Defizite der sensorischen Reizverarbeitung detektieren zu können (KRAEUTER et al., 2019). Hinsichtlich der Altersabhängigkeit dieses Verhaltens gibt es bereits einige Hinweise, dass junge Mäuse Nestbauaktivität in relevantem Ausmaß zeigen können: so demonstrierten Moy und Kollegen (2004), dass drei bis vier Wochen alte Mäuse verschiedener Stämme komplexe Nester konstruierten. Eine Studie mit adoleszenten Mäusen der Stämme C57BL/6N, FVB/N und DBA/2 konnte dahingegen keine relevante Nestbauaktivität detektieren (ELTOKHI et al., 2020). Es gibt zudem Studien in genetischen Mausmodellen, die relevante Beeinträchtigungen des Nestbauverhaltens bereits während der Entwicklung der Tiere beschrieben: die Untersuchung des Nestbauverhaltens 28 bis 78 Tage alter Mäuse eines *Neuropeptid-Y-knockin*-Modells zeigte, dass Tiere, die *Neuropeptid Y* überexprimierten, schlechtere Nester bauten als Wildtyp-Mäuse (CORDER et al., 2020). Bei sechs Wochen alten männlichen Mäusen eines *knockin*-Modells für das Rett-Syndrom, einer tiefgreifenden Autismus-Spektrum-Störung (PSCHYREMBEL ONLINE, 2022), wurde eine Beeinträchtigung des

Nestbauverhaltens festgestellt (WEGENER et al., 2014). Torres-Lista und Giménez Llorca (2013) haben demonstriert, dass sich das Nestbauverhalten in einem murinen Alzheimermodell altersabhängig unterscheidet. Eine Studie zum Einfluss von Deltamethrin bei adoleszenten Mäusen konnte keine Beeinträchtigungen des Nestbauverhaltens im Zusammenhang mit dem Pyrethroid darstellen (ZHANG et al., 2020). Die Analyse nichtmaternalen Nestbauverhaltens kann als sehr praktikabler Verhaltenstest zur Belastungseinschätzung der Tiere herangezogen werden, bei dem potenzielle Einflussfaktoren (SCHWABE et al., 2020) mit relativ geringem Aufwand eliminiert werden können. Zu beachten ist hierbei, dass normales Nestbauverhalten bei Mäusen die funktionelle Integrität des Hippocampus voraussetzt, wie bspw. durch eine experimentelle Scrapie-Infektion der Labormäuse sowie bei Mausmodellen der Alzheimer-Krankheit gezeigt werden konnte (JIRKOF, 2014). Daher ist in der tierexperimentellen Forschung die Analyse des Nestbauverhaltens von besonderer Relevanz bei Mausmodellen neurodegenerativer und neuropsychiatrischer Erkrankungen (BARKUS et al., 2012; JIRKOF, 2014; KRAEUTER et al., 2019).

5.3 Laufrad- und Heimkäfigaktivität

Im Rahmen der Erstellung eines Aktivitätsprofils im Heimkäfig, das auch den zirkadianen Rhythmus der Tiere abbilden kann (PERNOLD et al., 2019), hat sich die Analyse der Laufradaktivität als robuster Parameter zur Belastungseinstufung adulter Mäuse erwiesen (HÄGER et al., 2018). Mäuse sind hoch intrinsisch motiviert, das Laufrad zu nutzen, und die Bereitstellung eines durchgehend frei zugänglichen Laufrads im Heimkäfig kommt dem natürlichen Bewegungsbedürfnis der Tiere entgegen (MEIJER & ROBBERS, 2014). Meijer und Robbers (2014) stellten zudem fest, dass selbst Mäuse in freier Wildbahn, denen Laufräder angeboten werden, diese nutzten. Dabei unterschied sich die von den Mäusen in freier Wildbahn zurückgelegte Distanz im Laufrad nicht relevant von der, die Mäuse in Gefangenschaft zeigten (MEIJER & ROBBERS, 2014). Häger und Kollegen (2018) konnten in einem Mausmodell, bei dem die adulten Tiere durch mechanisch herbeigeführte Bewegungseinschränkung erhöhten Stresspegeln ausgesetzt waren, mittels Clusteranalyse einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Körpergewichts und der Laufradaktivität der Tiere über den Versuchsverlauf hinweg demonstrieren. Als Parameter zur Belastungseinstufung haben Häger und Kollegen (2018) basierend auf einem Algorithmus, der den

Zusammenhang und das Clustern von Laufradaktivitäts- und Körpergewichtsdaten beschreibt, eine weitere Validierung in unterschiedlichen Mausmodellen vorgenommen. So bestätigten die Analysen in einem Mausmodell Dextransulfat-Natrium (DSS)-induzierter chronischer Colitis (WEEGH et al., 2020; ZENTRICH et al., 2021), einem depressionsassoziierten Mausmodell für erlernte Hilflosigkeit (MALLIEN et al., 2020) sowie einem Pankreaskarzinom-Mausmodell (WEEGH et al., 2021) die Eignung von Laufradaktivität und Körpergewicht als Parameter zur Belastungseinschätzung und graduellen Abstufung tiermodellspezifischer Belastung. In der präklinischen Forschung wird die Laufradaktivität oft zur Detektion schmerzassozierten Verhaltens beim Labornager eingesetzt. Sie wurde als Parameter in Mausmodellen chronischer entzündungsvermittelter und neuropathischer Schmerzen validiert (CONTRERAS et al., 2021). Im Bereich der Neurowissenschaften wurde das Laufrad insbesondere im Zusammenhang mit der Untersuchung von Beeinträchtigungen des zirkadianen Rhythmus bei Mausmodellen neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt (LENG et al., 2019), so etwa bei sechs Wochen alten Mäusen mit Apolipoprotein-E-Defizienz, die einen genetischen Risikofaktor der Alzheimer-Krankheit darstellt (ZHOU et al., 2016). Hinsichtlich der Laufradaktivität junger Mäuse wurde demonstriert, dass junge Mäuse der Stämme C57BL/6, CFW und CF1 bereits vor Erreichen der sexuellen Reife relevante Laufradaktivität zeigten (GORDON & CORBITT, 2015). Dabei wurde die Zeit, die die Tiere im Laufrad verbrachten, sowie die Zeit, bis die Tiere mit dem Laufen im Rad begannen, untersucht und es konnten keine Unterschiede zwischen den Stämmen und zwischen den Geschlechtern festgestellt werden (GORDON & CORBITT, 2015). Hinsichtlich der Laufleistung von adulten Mäusen im Rad sind Geschlechtsunterschiede vielfach vorbeschrieben, wobei weibliche Mäuse größere Distanzen zurücklegten und längere Zeit mit der Laufradaktivität verbrachten als männliche Mäuse [bspw. (SWALLOW et al., 1998; BOWEN et al., 2012)]. Es gibt zudem Hinweise, dass der Geschlechtsunterschied bei Mäusen im Alter von zwei Monaten am größten ist und sich dann mit zunehmendem Alter der Tiere wieder verringert (BARTLING et al., 2017).

Neben der Laufradaktivität im Heimkäfig können weitere Daten der Heimkäfigaktivität auf der Basis softwaregestützter Detektion der Tiere (*Tracking*) erhoben werden. Hierzu zählen die von den Tieren zurückgelegte Distanz, die Geschwindigkeit der Bewegung und die Aufenthaltsdauer der Tiere in definierten Zonen. Dies bietet die Möglichkeit, zusätzliche Informationen zum Basisaktivitätsprofil sowie zum Fress- und Trinkverhalten der Tiere zu generieren. In tierexperimentellen Studien der Wirkstoffentwicklung spielen diese Daten als „digitale Biomarker“ (BARAN et al., 2022) eine zunehmend größere Rolle (BARAN et al., 2022). Wärmebildbasierte Systeme stellen den Prototyp der Heimkäfigüberwachung dar und sind aufgrund der relativ geringen Rohdatenmenge, die bei der Aufzeichnung generiert wird, auch für lange Untersuchungsperioden geeignet (VOIKAR & GABURRO, 2020). Der Nachteil dieser Systeme besteht darin, dass sie keine Einzeltiererkennung ermöglichen und die Datenqualität maßgeblich vom *Enrichment* des Käfigs beeinträchtigt wird (VOIKAR & GABURRO, 2020). Bei einem Großteil der heute kommerziell verfügbaren Käfigsysteme zur kontinuierlichen Aktivitätsüberwachung handelt es sich um videobasierte Systeme (VOIKAR & GABURRO, 2020). Diese sind derzeit alle für eine Einzeltierhaltung konzipiert (VOIKAR & GABURRO, 2020) und ermöglichen kein sicheres Erkennen des einzelnen Tieres bei Gruppenhaltung. Eine Möglichkeit der Einzeltiererkennung bieten Käfigsysteme, die auf Basis der Radiofrequenzidentifikation (RFID) (ZELDOVICH, 2016) arbeiten. Dabei wird den Tieren ein RFID-Transmitter unter kurzer Allgemeinanästhesie subkutan implantiert, über den sich Daten zum Einzeltier generieren lassen, sobald es sich im elektromagnetischen Feld befindet (VOIKAR & GABURRO, 2020). Es besteht zudem die Möglichkeit, videobasierte Systeme um RFID-Technologie zu ergänzen (VOIKAR & GABURRO, 2020). Bei einer Gruppenhaltungssituation kann die Verhaltensweise eines Tiers, wenn dieses einen separat per RFID-Antenne ausgeleuchteten Bereich (z. B. ein Laufrad) nutzt, sicher detektiert werden. Ansonsten ist eine individuelle Detektion jedes Tiers in der Gruppe sehr störungsanfällig, was eine große Limitation der RFID-basierten Heimkäfigüberwachung darstellt: befinden sich zwei RFID-Transmitter in unmittelbarer Nähe, können die korrespondierenden RFID-Antennen die Einzeltier-RFID-Information oft aufgrund von Signalkollisionsproblemen nicht mehr auslesen, sodass es bei einer Gruppenhaltungssituation zu erheblichem Datenverlust kommt (VOIKAR & GABURRO, 2020). Das Aufzeichnen einer

Trajektorie ist somit immer dann unterbrochen, wenn sich zwei Tiere im Bereich derselben Antenne befinden. Dies stellt insbesondere für den Einsatz bei der Belastungseinschätzung von Versuchstieren eine große Limitation der RFID-Technologie dar (VOIKAR & GABURRO, 2020). Weiter gibt es kommerziell verfügbare Heimkäfigsysteme, die einfache sowie komplexe Aktivitäten über Sensorplatten erfassen können (VOIKAR & GABURRO, 2020). Diese haben den Nachteil, dass Aktivitäten nicht über Videomaterial verifiziert werden können und einige Verhaltensweisen nicht klassifiziert werden können (VOIKAR & GABURRO, 2020). Während die vorgenannten Käfigsysteme alle für Hygienebarrieren mit offener Haltung konzipiert wurden, gibt es derzeit ein kommerziell verfügbares Heimkäfigsystem, das individuell belüftete Käfigeinheiten anbietet und sowohl für Einzel- als auch Gruppenhaltung konzipiert ist (VOIKAR & GABURRO, 2020).

6. Open-Field-Test

Die Platzierung einer Ratte in einer für sie unbekanntem Umgebung wurde bereits 1934 als Verhaltenstest beschrieben, um die Reaktion und das Verhalten des Tiers auf die unbekanntem Arena zu untersuchen (HALL, 1934). Dabei sollte die unbekanntem Arena einen „emotionalen Stimulus“ (HALL, 1934) für das Tier darstellen. Beim Open-Field-Test wird der Labornager in eine viereckige oder runde Arena gesetzt und das Verhalten des Tiers eine zuvor definierte Zeit lang erfasst (LEPPÄNEN et al., 2006). Zum einen haben Labornager eine natürliche Aversion gegen Neues (LEPPÄNEN et al., 2006; BOISSY et al., 2007), gegen Licht und offene, ungeschützte Räume, jedoch wecken unbekanntem Umgebungen zum anderen auch die Neugier der Tiere, die neuen Räume zu erkunden (LEPPÄNEN et al., 2006). Der Open-Field-Test ist daher beim Labornager ein Verhaltenstest im Spannungsfeld zwischen aversivem Stimulus und explorativer Tendenz (LEPPÄNEN et al., 2006). Er erlaubt sowohl Aussagen zur lokomotorischen Aktivität als auch zu angstassoziiertem Verhalten (WALSH & CUMMINS, 1976; SEIBENHENER & WOOTEN, 2015) und explorativer Aktivität (CAROLA et al., 2002). Nager haben als Beutetiere eine natürliche Tendenz, offene Umgebungen zu meiden (ARCHER, 1973) und halten sich daher bevorzugt in geschützteren Außenbereichen auf. Diese Tendenz wird als Thigmotaxis bezeichnet. Der Grad der

Thigmotaxis, den Labornager im Open-Field-Test zeigen, kann Aufschluss über die Ausprägung angstassozierten Verhaltens der Tiere geben (LEPPÄNEN et al., 2006). Thigmotaxis ist auch beim Menschen als Index für angstassoziertes Verhalten unter Berücksichtigung kognitiver und emotionaler Aspekte validiert worden (KALLAI et al., 2007). Hinsichtlich des Einsatzes des Open-Field-Tests bei jungen Mäusen gibt es Hinweise, dass die lokomotorische Aktivität junger Mäuse während aller drei Phasen der Adoleszenz erhöht ist (HEFNER & HOLMES, 2007; MOORE et al., 2011; MOLENHUIS et al., 2014; BRUST et al., 2015).

7. Irwin-Score

Beim Irwin-Score (IRWIN, 1968) handelt es sich um einen Verhaltenstest, der auf einer klassischen klinischen Untersuchung der Tiere basiert und heute routinemäßig im Rahmen pharmakologischer Sicherheitsstudien eingesetzt wird (LYNCH et al., 2011). Dieser Verhaltenstest zielt insbesondere darauf ab, Informationen über Veränderungen des autonomen Nervensystems der Tiere zu erfassen (IRWIN, 1968). Neben Informationen zum vegetativen Nervensystem kann der Irwin-Score insbesondere bei neurologischen Tiermodellen auch Aufschluss über den Allgemeinzustand der Tiere geben (Irwin, 1968; Moscardo et al., 2007; Lynch et al., 2011).

8. Fäkale Kortikosteronmetaboliten

Die adrenokortikale Aktivität von Säugetieren kann über die Analyse von Kortikosteronmetaboliten, die mit dem Kot ausgeschieden werden, bestimmt werden (PALME, 2019). Dabei hat sich die Bestimmung der fäkalen Kortikosteronmetabolitkonzentrationen als nichtinvasiver Parameter von hoher Praktikabilität erwiesen, der Aussagen über das Stresslevel in einer Vielzahl von Säugetieren ermöglichen kann (PALME, 2019). Bei der Labormaus kann die Bestimmung der adrenokortikalen Aktivität Aussagen über das Disstress-Niveau der Tiere ermöglichen, das die Tiere vier bis sechs Stunden vor der Probennahme erfahren haben (TOUMA et al., 2003; TOUMA et al., 2004). Bei adulten Tieren wurden geschlechtsspezifische Unterschiede beschrieben, wobei weibliche Mäuse höhere Metabolitkonzentrationen aufwiesen als männliche Mäuse (TOUMA et al.,

2003). Es gibt bereits Studien, die die adrenokortikale Aktivität bei jungen Mäusen untersucht haben (KOLBE et al., 2015; BAILOO et al., 2018; BAILOO et al., 2020). Es gibt Hinweise, dass Jungtiere kurz nach dem Zeitpunkt des Absetzens vom Muttertier erhöhte Kortikosteronmetabolitspiegel aufweisen (KOLBE et al., 2015). Altersabhängige Schwankungen adrenokortikaler Aktivität wurden zudem in einem genetischen Mausmodell für die Alzheimer-Krankheit festgestellt (AMBRÉE et al., 2006).

9. Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieses Dissertationsprojekts sollte eine Verhaltenstestbatterie entwickelt und validiert werden, die sich zur evidenzbasierten Belastungseinschätzung bei jungen Mäusen eignet.

Im ersten Teilprojekt wurden für die Entwicklung der Testbatterie Kandidatenparameter herangezogen, die zur Belastungseinschätzung adulter Labornager bereits in verschiedenen chronischen Tiermodellen validiert wurden (HÄGER et al., 2018; BLEICH et al., 2020; VAN DIJK et al., 2020). Ziel des ersten Teilprojekts war es, altersspezifische Verhaltensmuster weiblicher und männlicher Wildtyp-Mäuse zu erfassen sowie die Eignung der Kandidatenparameter für den Einsatz bei jungen Mäusen zu prüfen. Hierfür wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6JRj eingesetzt. Der Stamm C57BL/6J stellt den am häufigsten verwendeten Inzuchtstamm sowie einen häufig verwendeten Hintergrundstamm genetisch veränderter Mauslinien dar (MATSUO et al., 2010). Dabei sollte stets der Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die Untersuchungsergebnisse analysiert werden.

Basierend auf der Prüfung der Kandidatenparameter bei jungen Wildtyp-Mäusen sollte eine Verhaltenstestbatterie entwickelt und validiert werden, die sich für ein kontinuierliches Monitoring genetisch veränderter Mäuse im Laufe der Individualentwicklung der Tiere eignet mit dem Ziel, den Zeitpunkt und die Ausprägung von Verhaltensveränderungen bei den jungen Tieren zu detektieren. Dabei sollte stets der Einfluss des Genotyps und des Geschlechts auf die Untersuchungsergebnisse analysiert werden. Zudem sollten die Korrelation der Parameter geprüft und die Hauptkomponenten der modell- und altersspezifischen Datensätze identifiziert werden. Anhand dieser Ergebnisse sollte die kumulative Belastung der eingesetzten genetisch veränderten Mauslinien B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf}/J x 129S1/Sv-Hprt^{tm1(cre)Mnn}/J und B6N.129-Gria1^{tm1Rsp}/J evaluiert werden und eine laborspezifische Empfehlung für die Einstufung des Schweregrads der Belastung der Linien erarbeitet werden.

Bei den im Rahmen des zweiten und dritten Teilprojekts eingesetzten Mausmodellen handelt es sich um genetische *loss-of-function* Modelle mit neurologischer bzw. neuropsychiatrischer Relevanz und entwicklungspathologischer Komponente. Die phänotypische Charakterisierung

der Tiere im Laufe ihrer Individualentwicklung sollte daher auch einen Beitrag zur Prüfung der Augenscheinvalidität des *Scn1a*-A1783V-Modells und des *Grial*-Modells leisten.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden im Einklang mit der RL 2010/63/EU und dem TierSchG durchgeführt. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden gemäß den ARRIVE-Richtlinien (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) sowie der Basel-Erklärung (www.basel-declaration.org) einschließlich des 3R-Prinzips durchgeführt und veröffentlicht. Die Genehmigung aller Tierversuche wurde von der Regierung von Oberbayern erteilt (Maximilianstr. 39, 80538 München, Aktenzeichen ROB-55.2-2532.Vet_02-19-157).

1.1 C57BL/6 Wildtyp-Mäuse

Trächtige Mäuse ($n = 51$) des Stammes C57BL/6JRj (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich), die sich bei Ankunft im Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät, LMU München, in den Trächtigkeitsstadien (E) E10, E11 und E13, befanden, wurden in individuell belüfteten Käfigen (IVC-Käfige vom Typ II (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland)) einzeln gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen (22-24 °C, 45-60 % Luftfeuchtigkeit) in einem 12-stündigen Hell-/Dunkelphasenrhythmus (Helligkeitsphasen von 5:00 bis 17:00 Uhr MEZ, 6:00 bis 18:00 Uhr MESZ) mit *ad libitum* Zugang zu Futter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser. Die Käfige waren ausgestattet mit Einstreumaterial (Lignocel Select, J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland), 14 g Nestmaterial (Enviro-Dri, Claus GmbH, Limburgerhof, Deutschland), einem Holzstab (Labodia AG, Niederglatt, Schweiz) und einem dreieckigen Maushaus (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland). Das Umsetzen der Muttertiere mit Wurf erfolgte an den postnatalen Tagen (P) 6 und 14. Mit dem Absetzen an P21 wurden die Versuchstiere ($n = 200$) randomisiert (www.randomizer.org) und in 100 Experimentaleinheiten ($n = 2$) unterteilt. Eine Experimentaleinheit bestand aus zwei gleichgeschlechtlichen Wurfgeschwistern. Die Experimentaleinheiten wurden ab dem Tag des Absetzens an P21 in Makrolon-Typ-III-Käfigen (Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland) gehalten, die jeweils mit Einstreumaterial (Lignocel Select), zwei Nestlets (Ancare, Bellmore, New York, USA) und einem viereckigen Maushaus (Zoonlab GmbH)

ausgestattet waren. Die Käfiganordnung wurde randomisiert (www.randomizer.org). Das Umsetzen der Tiere, die sich nicht im Versuch befanden, fand wöchentlich Dienstag vormittags statt.

Während der Versuche wurden die Experimentaleinheiten in PhenoTyper-Käfigen (Noldus, Wageningen, Niederlande) mit kontinuierlicher Videoaufzeichnung (EthoVision XT15, Noldus, RRID:SCR_000441) gehalten, die den Tieren in dieser Zeit als Heimkäfig dienten. Jeder PhenoTyper-Käfig war mit 200 g (+/- 5 g) Einstreumaterial (Lignocel Select), 2 Nestlets (Ancare), einem viereckigen Haus (Noldus) und zwei Trinkflaschen (Noldus) ausgestattet. Während den ersten vier Tage der Versuchswoche hatten die Tiere zusätzlich freien Zugang zu einem Laufrad (PhenoWheel, Noldus), das an einer austauschbaren PhenoTyper-Käfigwand arretiert war.

Die Haltung der trächtigen Muttertiere, deren Nachkommen und der Versuchstiere fand in der Tierhaltungsbarriere des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät, LMU München, statt. In dieser Barriere wurde ein Hygienemonitoring gemäß FELASA-Richtlinien mit Einstreusentinels durchgeführt (vierteljährliche serologische Untersuchung und halbjährliche Lebendtiereinsendung). Die Ergebnisse der Gesundheitsüberwachung aus diesem Zeitraum lieferten keinen Hinweis auf das Vorkommen SPF-relevanter Erreger.

1.2 *Scn1a*-A1783V-Modell

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere ($n = 40$) sowie die Durchführung der Experimente fand im Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät, LMU München, statt. Die parentalen Linien B6(Cg)-*Scn1a*^{tm1.1Dsf}/J (JAX Stock #026133, The Jackson Laboratory (KUO et al., 2019; RICOBARAZA et al., 2019)) und 129S1/Sv-*Hprt*^{tm1(CAG-cre)Mnn}/J (JAX Stock #004302, The Jackson Laboratory (TANG et al., 2002)) wurden im Institut für Pharmakologie als Elterntierkolonie durch kontinuierliche Bruder-Schwester-Verpaarung aufrechterhalten. Die Zucht der Versuchstiere erfolgte durch Verpaarung zwölf weiblicher Mäuse des Stammes 129S1/Sv-*Hprt*^{tm1(CAG-cre)Mnn}/J mit sechs männlichen Tieren mit dem Stammhintergrund B6(Cg)-*Scn1a*^{tm1.1Dsf}/J. Die zwölf weiblichen Mäuse mit 129S1/Sv-Hintergrund waren heterozygot für die Cre-Rekombinase (Cre^{+/-}). Die sechs männlichen Tiere hatten ein gefloxtes *Scn1a*-Gen und wiesen als konditionales *knockin*-Modell die heterozygote Missense-

Mutation A1783V in Exon 26 auf. Durch die Verpaarung der „Cre-transgenen“ Linie, die die Cre-Rekombinase heterozygot exprimiert, kommt es zur Katalysation der Rekombination zwischen zwei 34 bp loxP Erkennungssequenzen, was zur Mutation des *Scn1a*-Gens führt. Von den Jungtieren, die aus den Verpaarungen hervorgingen und lebend geboren wurden ($n = 60$), überlebten 53 Jungtiere bis zum Tag des Absetzens an P19. 22 Jungtiere (11 weiblich, 11 männlich) waren heterozygot für *Scn1a*-A1783V (*Scn1a*^{+/-}) und 31 Jungtiere waren *Scn1a*-A1783V WT (*Scn1a* WT). Die Tiere wurden anhand ihres *Scn1a*-A1783V-Genotyps in die Experimental- und Kontrollgruppe unterteilt. Tiere der Experimentalgruppe ($n = 20$, weiblich/männlich 10/10), die die heterozygote A1783V-*Scn1a*-Genmutation trugen, werden im Folgenden als „*Scn1a*^{+/-}“ Tiere bezeichnet. Tiere der Kontrollgruppe ($n = 20$, weiblich/männlich 10/10), die das *Scn1a* Wildtyp (WT)-Gen tragen, werden im Folgenden als „*Scn1a* WT“ Tiere bezeichnet. Die Expression der Cre-Rekombinase (Cre^{+/-} oder Cre WT) wurde bei der Gruppeneinteilung nicht berücksichtigt, da hierdurch keine Effekte auf den Phänotyp der Tiere erwartet wurden (MILJANOVIC et al., 2021b). Alle Jungtiere wurden mittels Ohrstanzproben genotypisiert, die im Zuge der Markierung an P19 beim Absetzen genommen wurden. Alle Versuchstiere ($n = 40$) wurden zudem nach Abschluss der Experimente ein zweites Mal über Schwanzspitzenproben genotypisiert, die post-Euthanasie entnommen wurden. Die Genotypisierung erfolgte anhand eines Protokolls, das von unserer Arbeitsgruppe bereits publiziert wurde (MILJANOVIC et al., 2021b). Bei jedem Tier wurde eine PCR zur Bestätigung des *Scn1a*-A1783V-Genotyps (Abb. 1) sowie eine zweite PCR zur Detektion der Expression der Cre-Rekombinase durchgeführt. Eine Übersicht über die zur Genotypisierung verwendeten Primer befindet sich im Anhang.

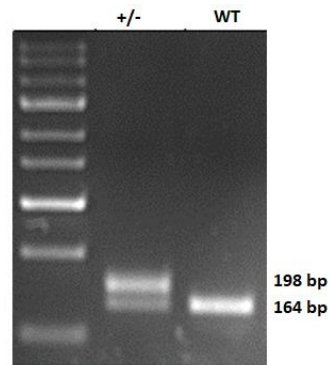


Abbildung 1. PCR (Elektrophoresegel, Agarose 5 %). Die Darstellung zeigt das Ergebnis einer PCR zur Bestätigung des *Scn1a*-A1783V-Genotyps. *Scn1a* WT: 164 bp, *Scn1a*^{+/-}: 164 bp und 198 bp. WT Wildtyp, +/- heterozygot. Die linke Bande stellt den *GeneRuler* dar.

Weibliche Zuchttiere mit Wurf wurden unter konstanten Umweltbedingungen (22-24 °C, 45-60% Luftfeuchtigkeit) in individuell belüfteten Käfigen (IVC-Typ-II, Tecniplast Deutschland GmbH) in einem 12-stündigen Hell-/Dunkelphasen Rhythmus (Helligkeitsphasen von 5:00 bis 17:00 Uhr MEZ, 6:00 bis 18:00 Uhr MESZ) gehalten. Dabei erhielten die Tiere *ad libitum* Zugang zu Futter (Ssniff Spezialdiäten GmbH) und Leitungswasser. Die Käfige waren ausgestattet mit Einstreumaterial (Lignocel Select), 14 g Nestmaterial (Enviro-Dri, Claus GmbH), einem Holzstab (Labodia AG) und einem dreieckigen Maushaus (Zoonlab GmbH). Von P14-26 wurden die Tiere täglich zugefüttert mit einem Schälchen *DietGel76A* (Ssniff Spezialdiäten GmbH) pro Käfig, das mit 5-7 ml einer 10%igen Glukose Lösung angereichert wurde. Das Markieren und Entnehmen der Ohrbiopsien im Rahmen des Absetzens wurde an P19 zwischen 17:00 und 19:00 Uhr (MEZ) durchgeführt. Nach dem Absetzen wurden die Tiere in gleichgeschlechtlichen Gruppen von vier bis sechs Tieren pro Käfig in Makrolon-Typ-III-Käfigen (Ehret GmbH & Co. KG) gehalten, die ausgestattet waren mit Einstreumaterial (Lignocel Select), Nestmaterial (Enviro-Dri, Claus GmbH) sowie zwei Nestlets (Ancare) und einem viereckigen Maushaus (Zoonlab GmbH).

Die Versuchstiere ($n = 40$) wurden von P26 an in gleichgeschlechtlichen Zweiergruppen (Experimentaleinheit, $n = 2$) in Makrolon-Typ-III-Käfigen (Ehret GmbH & Co. KG) gehalten, die ausgestattet waren mit Einstreumaterial (Lignocel Select), zwei Nestlets (Ancare) und einem viereckigen Maushaus (Zoonlab GmbH). Die Tiere wurden einmal wöchentlich umgesetzt. Die Anordnung der Käfige war

randomisiert (www.randomizer.org). Die Einteilung der Versuchstiere in die Experimentaleinheiten ($n = 20$) erfolgte anhand des *Scn1a*-A1783V-Genotyps. Wenn möglich, wurden Wurfgeschwister für eine Experimentaleinheit verwendet. Während der viertägigen Untersuchungsphase jeweils in der frühen und späten Adoleszenz wurden die Experimentaleinheiten ($n = 20$) in PhenoTyper-Käfigen (Noldus), die den Tieren in dieser Zeit als Heimkäfige dienten, mit kontinuierlicher Videoüberwachung (EthoVision XT 15) gehalten. Jeder PhenoTyper-Käfig war ausgestattet mit 200 g Einstreumaterial (± 5 g) (Lignocel Select), zwei Nestlets (Ancare), einem viereckigen Maushaus (Noldus) und zwei Trinkflaschen (Noldus).

In der betreffenden Tierhaltungsbarriere des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät, LMU München, wurde ein Hygienemonitoring gemäß FELASA-Richtlinien mit Einstreusentinelns durchgeführt (vierteljährliche serologische Untersuchung und halbjährliche Lebendtiereinsendung). Die Ergebnisse der Gesundheitsüberwachung in dem Zeitraum sechs Monate vor und sechs Monate nach den Versuchen lieferten keinen Hinweis auf das Vorkommen SPF-relevanter Erreger.

1.3 *Gria1*-Modell

Die Zucht der Versuchstiere erfolgte im Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät, LMU München. Hierfür wurden 19 weibliche und 7 männliche *Gria1* heterozygote (*Gria1*^{+/-}) Mäuse der Elterntierlinie B6N.129-*Gria1*^{tm1Rsp}/J (erhältlich bei The Jackson Laboratory, JAX Stock #019011, Mouse Genome Informatics ID: MGI:2178057) verpaart. Diese 26 Zuchttiere wurden dem Institut für Pharmakologie von der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) Heidelberg, Heidelberg Universität, im Rahmen einer Kooperation der DFG-Forschungsgruppe FOR2591 geliefert. Die Generierung und Erstbeschreibung der Linie erfolgte durch Zamanillo und Sprengel (1999). Die Linie wurde sodann über Embryotransfer für eine SPF-Haltung im IBF Heidelberg saniert und dort als Elterntierkolonie etabliert. Am IBF Heidelberg wurde die Elterntierkolonie erhalten über die Rückkreuzung auf C57BL6/N Hintergrund über mehr als zehn Generationen.

Die Jungtiere wurden anhand ihres *Gria1*-Genotyps in die Versuchsgruppe und die Kontrollgruppe unterteilt. Die Versuchsgruppe umfasste *Gria1*-knockout(*Gria1*^{-/-})-Tiere ($n = 18$, weiblich:männlich, $n = 10:8$), die im Folgenden als „*Gria1*^{-/-}“ Tiere

bezeichnet werden. Die Kontrollgruppe umfasste *Grial*^{+/+} (WT für *Grial*) Tiere, die im Folgenden als „*Grial* WT“ Tiere ($n = 20$, weiblich:männlich, $n = 10:10$) bezeichnet werden. Alle Jungtiere wurden zwischen P16 und P19, vor dem Absetzen an P21, über eine Ohrstanzprobe genotypisiert. Alle Versuchstiere wurden nach Abschluss der Versuche post-Euthanasie ein zweites Mal über eine Schwanzspitzenbiopsie genotypisiert. Die Genotypisierung erfolgte wie von Zamanillo und Sprengel (1999) beschrieben (Abb. 2).

Die Zuchttiere wurden in Makrolon-Typ-III-Käfigen (Ehret GmbH & Co. KG) gehalten, die ausgestattet waren mit Einstreumaterial (Lignocel Select), Nestmaterial (Enviro-Dri, Claus GmbH), zwei Nestlets (Ancare) und einem dreieckigen Maushaus (Zoonlab GmbH).

Vom Tag des Absetzens an P21 an wurden die Versuchstiere ($n = 38$) in gleichgeschlechtlichen Zweiergruppen als Experimentaleinheiten ($n = 2$) gehalten. Die Einteilung basierte auf dem *Grial*-Genotyp. Wenn möglich, wurden Wurfgeschwister für eine Experimentaleinheit verwendet. Die Experimentaleinheiten ($n = 19$) wurden unter kontrollierten Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen gehalten (22-24 °C, 45-60% Feuchtigkeit) in einem 12-Stunden Hell/Dunkel-Phasen Rhythmus mit *ad libitum* Zugang zu Futter (Ssniff Spezialdiäten GmbH) und Leitungswasser. Jede Experimentaleinheit wurde in einem Makrolon-Typ-III-Käfig (Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland) gehalten, der ausgestattet war mit Einstreumaterial (Lignocel Select), zwei Nestlets (Ancare) und einem viereckigen Maushaus (Zoonlab GmbH). Die Anordnung der Käfige war randomisiert (www.randomizer.org). Die Tiere wurden einmal wöchentlich umgesetzt. Während einer viertägigen Untersuchungsphase jeweils in der frühen und späten Adoleszenz (Fig. 1) wurden die Experimentaleinheiten ($n = 20$) in einem Heimkäfigsystem mit kontinuierlicher Videoüberwachung (PhenoTyper, Noldus) gehalten. Die Analyse des Videomaterials erfolgte mit der Software EthoVision XT 15. Jeder PhenoTyper-Käfig war ausgestattet mit 200 g Einstreumaterial +/- 5 g (Lignocel Select), zwei Nestlets (Ancare), einem viereckigen Maushaus (Noldus) und zwei Trinkflaschen (Noldus).

In der Tierhaltungsbarriere im IBF Heidelberg, Heidelberg Universität, in der die Zucht der Elterntierkolonie stattfand, wurde ein Hygienemonitoring gemäß FELASA-Richtlinien mit vierteljährlicher serologischer Untersuchung von

Einstreusentinels durchgeführt. Die Ergebnisse der Hygienemonitorings aus dem Zeitraum der letzten sechs Monate vor Lieferung der Zuchttiere aus dem IBF Heidelberg an das Institut für Pharmakologie lieferten keinen Hinweis auf das Vorhandensein SPF-relevanter Erreger. Die Zuchttiere, die vom IBF Heidelberg geliefert wurden, wurden in der Tierhaltungsbarriere im Institut für Pharmakologie nach dem Rein-Raus-Verfahren eingestellt. Zusätzlich wurde für die betreffende Tierhaltungsbarriere im Institut für Pharmakologie ein Hygienemonitoring der Zucht- und Versuchstiere mit Einstreusentinels gemäß FELASA Richtlinien durchgeführt (serologische Untersuchung). Die Ergebnisse dieses Hygienemonitorings bei Versuchsende lieferten keinen Hinweis auf das Vorhandensein SPF-relevanter Erreger.

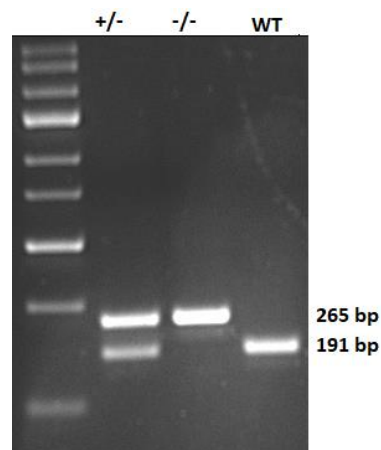


Abbildung 2. PCR (Elektrophoresegel, Agarose 5 %). Die Darstellung zeigt das Ergebnis einer PCR zur Bestätigung des *Grial*-Genotyps. *Grial* WT: 191 bp, *Grial*+/- 265 bp und 191 bp, *Grial*-/- 265 bp. WT Wildtyp, +/- heterozygot, -/- knockout. Die linke Bande stellt den *GeneRuler* dar.

2. Studiendesign

2.1 C57BL/6 Wildtyp-Mäuse

Die im Institut für Pharmakologie geborenen Versuchstiere ($n = 200$) des Stammes C57BL/6JRj wurden randomisiert als Experimentaleinheiten (gleichgeschlechtliche Wurfgeschwister, $n = 2$) in fünf Gruppen ($n = 40$) eingeteilt (www.randomizer.org) und wuchsen sodann unter standardisierten Haltungsbedingungen bis zum Erreichen des Testalters auf, in dem die Tiere die einwöchige Verhaltenstestbatterie durchliefen (Abb. 3). Jede der fünf Altersgruppen ($n = 40$) setzte sich aus 20 weiblichen und 20 männlichen Tieren zusammen. Die Gruppeneinteilung sollte die verschiedenen Stadien der Individualentwicklung der Labormaus repräsentieren (Tabelle 1 i. V. m. Tabelle 4).

Die Phase der Adoleszenz kann nach einer Definition von Brust und Kollegen (2015) in drei Entwicklungsabschnitte unterteilt werden, an denen sich auch die Einteilung der Gruppen orientiert: 1) Phase der Präpubertät (Alter der Tiere im Versuchszeitraum: P25 bis P31), 2) Phase der Pubertät (P36 bis P42) und 3) Phase nach Erreichen der sexuellen Reife (P50 bis P57). Als adulte Vergleichsgruppen wurden 4) jung adulte Tiere (P65 bis P72) und 5) reif adulte Tiere (P120-P127) herangezogen. Die Einbeziehung einer älteren, reif adulten Vergleichsgruppe erfolgte, da Mäuse im Alter von rund drei Monaten häufig in der neurowissenschaftlichen Forschung eingesetzt werden.

Die Benennung der Gruppen erfolgt im Folgenden anhand der Entwicklungsphase, in der sich die Tiere während der jeweiligen Versuchswoche befanden (Abb. 3): P25 für die Gruppe „Präpubertät“, P36 für die Gruppe „Pubertät“, P50 für die Gruppe „Sexuelle Reife“, P65 für die Gruppe „Jung adult“, P120 für die Gruppe „Reif adult“. Tiere in der Spätadoleszenz (P48 bis P60) werden im Folgenden für alle Teilprojekte aus Gründen der einfacheren Begrifflichkeit als „sexuell reife“ Tiere bezeichnet, obwohl diese Bezeichnung auch für über 60 Tage alte Tiere zutreffen würde.

Pro Versuchswoche konnten zwölf Tiere untersucht werden. Die Untersuchung jeder Altersgruppe ($n = 40$) wurde auf vier *Batches* aufgeteilt, woraus sich für die fünf Altersgruppen eine Gesamtdauer der Experimente von 20 Wochen ergab. Die *Batches* wurden zur Vermeidung von *Batch*-Effekten so geschachtelt, dass die Altersgruppen zeitlich alternierend untersucht werden konnten. Der

wiederkehrende Wochenrhythmus wurde gewählt, um den Einfluss externer Faktoren in der Tierhaltung (bspw. Tierkontrolle, Umsetzen, Reinigung) auf die Experimente zu minimieren.

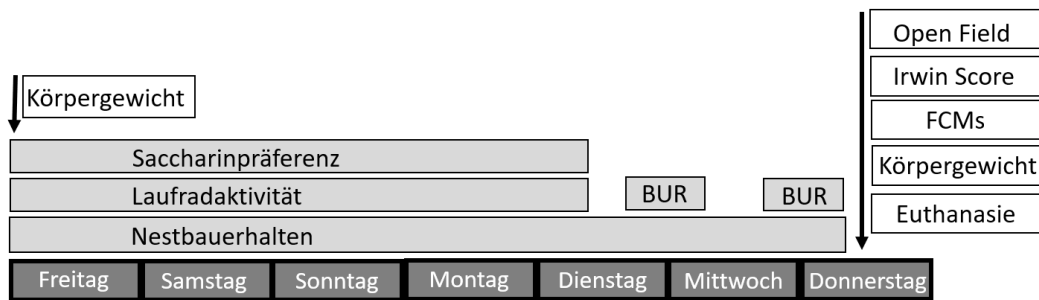


Abbildung 3. Schematische Übersicht über eine Versuchswoche. Der Versuchsaufbau setzt sich aus 20 gleich aufgebauten Wochen zusammen. BUR = Burrowing-Test, FCMs = fäkale Kortikosteronmetaboliten.

Tabelle 4. Gruppenzuordnung der Versuchstiere und Aufschlüsselung der Altersspannen. * Zuchtbedingte Altersabweichung (in Tagen) vom in Spalte „Test“ angegebenen Alter, w = weiblich, m = männlich, SP = Saccharinpräferenz, NEST = Nestbauverhalten, VWR = Laufradaktivität (Voluntary-Wheel-Running), BUR = Burrowing-Test, OF = Open-Field-Test, IRW = Irwin-Score, FCM = Fäkale Kortikosteronmetaboliten, KG = Körpergewicht.

Gruppe	Altersphase	n (w/m)	Test (Alter)	Abweichung * in Tagen
P25	Präpubertät	20/20	SP, NEST, VWR (P25-P29)	+/- 0
			BUR (P29 und P30)	
			OF, IRW, FCM (P31)	
			KG (P25 und P31)	
P36	Pubertät	20/20	SP, NEST, VWR (P36-P40)	- 1
			BUR (P40 und P41)	
			OF, IRW, FCM (P42)	
			KG (P36 und P42)	
P50	Sexuelle Reife	20/20	SP, NEST, VWR (P50-P54)	+/- 0
			BUR (P54 und P55)	
			OF, IRW, FCM (P56)	
			KG (P50 und P56)	
P65	Junges Erwachsenalter	20/20	SP, NEST, VWR (P65-P69)	+/- 0
			BUR (P69 und P70)	
			OF, IRW, FCM (P71)	
			KG (P65 und P71)	
P120	Reifes Erwachsenalter	20/20	SP, NEST, VWR (P120- P124)	- 3
			BUR (P124 und P125)	
			OF, IRW, FCM (P126)	
			KG (P120 und P126)	

2.2 *Scn1a*-A1783V-Modell und *Grial*-Modell

Anhand der Kandidatenparameter, die im vorausgegangenen Teilprojekt bei C57BL/6 Wildtyp-Mäusen validiert wurden und sich als geeignet erwiesen haben, wurde eine Verhaltenstestbatterie zusammengestellt, die die jungen Tiere des *Scn1a*-A1783V-Modells und des *Grial*-Modells in den folgenden zwei Teilprojekten durchliefen (Abb. 4). Der Klassifizierung von Brust und Kollegen (2015) folgend wurden die Hauptuntersuchungen während der frühen Adoleszenz (Präpubertät, ab P22) und der späten Adoleszenz (Phase der sexuellen Reife, ab P48) der Tiere durchgeführt (Abb. 4). Die im Institut für Pharmakologie gezüchteten und geborenen Versuchstiere (*Scn1a*-A1783V-Modell: $n = 40$, *Grial*-Modell: $n = 38$) wurden anhand des *Scn1a*- bzw. *Grial*-Genotyps eingeteilt und wuchsen sodann als gleichgeschlechtliche Experimentaleinheiten ($n = 2$) unter standardisierten Haltungsbedingungen bis zum Erreichen des Testalters auf. Die beiden Gruppen des *Scn1a*-A1783V-Modells setzten sich je zur Hälfte aus weiblichen und männlichen Tieren zusammen (*Scn1a*^{+/-} Mäuse: n (weiblich) = 10, n (männlich) = 10; *Scn1a* WT Mäuse: n (weiblich) = 10, n (männlich) = 10). Hinsichtlich des Geschlechts gestaltete sich die Gruppenzusammensetzung der Tiere des *Grial*-Modells wie folgt: *Grial*^{-/-} Mäuse: n (weiblich) = 10, n (männlich) = 8; *Grial* WT Mäuse: n (weiblich) = 10, n (männlich) = 10.

Der Aufbau der Testbatterie war einheitlich gestaltet für den Einsatz bei beiden Tiermodellen. Mit Blick auf die erwartete modellspezifische Belastung der Tiere im Laufe ihrer Individualentwicklung wurde die Verhaltenstestbatterie für die Versuche im *Scn1a*-A1783V-Modell wie folgt modifiziert (Abb. 4):

- 1) Die Verhaltensuntersuchungen starteten erst an P27, da die Mortalität der belasteten Tiere der Linie *Scn1a*^{tm1.1Dsf/J} x 129S1/Sv-Hprt^{tm1(cre)Mnn/J} in den ersten Tagen nach dem Absetzen, insbesondere zwischen P19 und P26 erwartungsgemäß am höchsten ist (MILJANOVIC et al., 2021b) und die Tiere in dieser Phase intensiv gepflegt werden sollten.

- 2) Da Beobachtungen im Rahmen vorausgegangener Untersuchungen im *Scn1a*-A1783V-Modell darauf hindeuteten, dass das Muttertier reduziertes maternales Verhalten gegenüber den belasteten Jungtieren zeigte, wurde im Rahmen eines Pilotprojekts ein Wurf mit Muttertier über Wärmebildaufzeichnung kontinuierlich überwacht. Dies erfolgte in dem Zeitraum zwischen dem Auftreten erster Anfälle an P16 (MILJANOVIC et al., 2021b) und dem Absetzen der Jungtiere vom Muttertier an P19.
- 3) Aufgrund der erwarteten epileptischen Anfälle und motorischen Defizite der *Scn1a*+/- Tiere und dem damit verbundenen Verletzungsrisiko wurde den Tieren kein Laufrad angeboten.

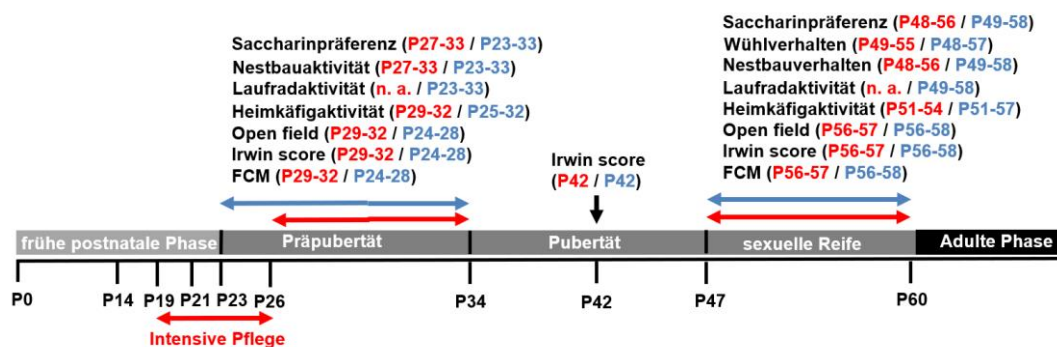


Abbildung 4. Schematische Übersicht des Versuchsablaufs im *Scn1a*-A1783V- und *Grial*-Modell. Die Altersspanne der Tiere, innerhalb der die Tests jeweils durchgeführt wurden, sind in den Klammern angegeben. Die modellspezifische Anpassung der Testbatterie ist farblich hervorgehoben: rote Angaben beziehen sich auf das *Scn1a*-A1783V Modell, blaue Angaben beziehen sich auf das *Grial* Modell. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde der Zeitpunkt des Absetzens der Jungtiere vom Muttertier (*Scn1a*-A1783V-Modell P19, *Grial*-Modell P21) und die Wärmebild-Videouberwachung eines Muttertiers mit Wurf von P16 bis P19 im *Scn1a*-A1783V-Modell nicht dargestellt. P = postnataler Tag, FCM = fäkale Kortikosteronmetaboliten.

3. Verhaltensuntersuchungen

3.1 Saccharinpräferenz

Die Präferenz einer angebotenen süßen Lösung (hier: Saccharin) im Vergleich zu den Labornagern zeitgleich angebotenen Wasser kann Hinweise auf Verhaltenszüge der Tiere geben, die mit Anhedonie oder Schmerz assoziiert werden können (CRAWLEY, 2006; DE LA PUENTE et al., 2015; KLEIN et al., 2015). Der Einsatz einer Saccharinlösung bietet gegenüber einer Sucroslösung den Vorteil, dass ein geringerer Einfluss auf das Körpergewicht und den Energiebedarf der Tiere und damit verbundene Datenerhebungen besteht. Die Durchführung des Saccharinpräferenztests erfolgte an vier aufeinanderfolgenden Tagen im PhenoTyper-Käfig. Dieser diente den Tieren ($n = 2$ pro PhenoTyper-Käfig) in dieser Zeit als Heimkäfig (Abb. 3, 4). Die Durchführung des Saccharinpräferenztests erfolgte gemäß einem Testprotokoll, das von Klein und Kollegen (2015) entwickelt wurde: an einer Wand des PhenoTyper-Käfigs waren nebeneinander zwei Flaschen arretiert, die am ersten und dritten Tag mit jeweils 200 g Leitungswasser (± 1 g) gefüllt wurden. Am zweiten und vierten Tag enthielt eine der Flaschen 200 g einer 0.1 % Saccharinlösung (Aldrich Saccharin $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), während die andere mit 200 g Leitungswasser gefüllt war. Am zweiten Tag wurde die Flasche mit der Saccharinlösung auf der linken Seite angebracht, am vierten Tag wurde die Flasche mit der Saccharinlösung auf der rechten Seite angebracht. Die Alternierung der Position erfolgte, um eine eventuelle Seitenpräferenz auszugleichen. Die Flaschen wurden nach exakt 24 Stunden gewogen, um die jeweilige Flüssigkeitsaufnahme zu bestimmen.

3.2 Nestbauverhalten

Das Nestbauverhalten der Tiere im PhenoTyper-Käfig ($n = 2$ pro PhenoTyper-Käfig), der den Tieren in dieser Zeit als Heimkäfig diente, wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Jirkof und Kollegen (2013b) analysiert. Das Nestbauverhalten der Tiere wurde im ersten Teilprojekt an sechs aufeinanderfolgenden Tagen analysiert, die die Tiere im PhenoTyper-Käfig verbrachten (Abb. 3). Das Nestbauverhalten der Tiere in den Teilprojekten 2 und 3 wurde an jeweils vier Tagen in der frühen Adoleszenz und an vier Tagen in der späten Adoleszenz untersucht (Abb. 4). Dabei wurden täglich morgens Bilder der Nester der Tiere angefertigt. Die Bilder wurden

im Abstand von 24 Stunden (+/- 1 Stunde) morgens zwischen 6:00 und 9:00 Uhr (MEZ) oder 5:00 und 8:00 Uhr (MESZ) aufgenommen. Die Bilder umfassten eine Aufsicht sowie zwei Seitenansichten, eine mit 90 ° und eine mit 45 °. Es existieren verschiedene Protokolle zur Analyse des Nestbauverhaltens von Labornagern [bspw. (DEACON, 2006a; JIRKOF et al., 2013b; KRAEUTER et al., 2019)]. Für die bildgestützte Auswertung der Form und Komplexität des Nests wurde basierend auf einer geringgradig modifizierten Version (BOLDT et al., 2021) des Protokolls von Jirkof und Kollegen (2013b) die folgende Punkteskala angewandt:

- Score 1: Nestlets sind fast nicht manipuliert (> 90% sind intakt).
- Score 2: Nestlets sind geringfügig manipuliert (50-90% sind intakt).
- Score 3: Nestlets sind stark manipuliert (50-90% sind zerrissen).
- Score 4: Flaches Nest (> 90% sind zerrissen, Fetzen befinden sich in einer Ecke des Käfigs, < 50% der Wände sind höher als die Maus).
- Score 5: Fast perfektes Nest (> 90% sind zerrissen, > 50% der Wände sind höher als die Maus).
- Score 6: Perfektes Nest (> 90% sind zerrissen, > 90% der Wände sind höher als die Maus).

Die Auswertung wurde von einer Person durchgeführt, die in Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit verblindet war. Die Auswertung wurde für alle drei Teilprojekte von derselben Person durchgeführt.

3.3 Wühlverhalten

Das Wühlverhalten der Tiere wurde in der Hell- und Dunkelphase analysiert. Die Tests wurden im PhenoTyper-Käfig, der den Tieren als Heimkäfig diente, oder in Makrolon-Typ-III-Heimkäfigen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Jirkof und Kollegen (2013a). Zur Analyse des Wühlverhaltens in der Hellphase wurde zwei Stunden vor Beginn der Dunkelphase eine durchsichtige Plastikflasche (Länge: 20 cm, Durchmesser des Flascheneingangs: 3,5 cm; Zoonlab GmbH), die mit 200 g \pm 1 g Futterpellets (Ssniff Spezialdiäten GmbH) gefüllt war, im Heimkäfig platziert. Nach 120 Minuten wurde die Flasche mit den hierin verbliebenen Pellets gewogen, um die Menge an Pellets zu bestimmen, die nach dem Test im Käfig verteilt waren. Die im Käfig verteilten Futterpellets wurden sodann entfernt und die gewogene Flasche für die Analyse des Wühlverhaltens in der Dunkelphase wieder in den Heimkäfig gelegt. Am nächsten Tag wurde direkt im Anschluss an die Dunkelphase die

Flasche nochmals gewogen, um die Menge der Pellets zu bestimmen, die nach der Dunkelphase im Heimkäfig verteilt waren. Die Tests wurden im Hinblick auf einen möglichen Trainingseffekt am darauffolgenden Tag wiederholt.

3.4 Laufrad- und Heimkäfigaktivität

Die Laufradaktivität wurde über einen Zeitraum von vier Tagen im PhenoTyper-Käfig, der den Tieren in dieser Zeit als Heimkäfig diente, analysiert. Hierbei hatten die Tiere ununterbrochen freien Zugang zu einem Laufrad (Durchmesser: 15 cm, Breite: 7 cm; PhenoWheel, Noldus, Wageningen, Niederlande), das an einer Wand des PhenoTyper-Käfigs arretiert war. Die Analyse der Laufradaktivität erfolgte über die Software EthoVision XT 15, die die Umdrehungen des Rads pro Zeiteinheit (exakt 60 Sekunden) erfasste.

Die Analyse der Heimkäfigaktivität wurde ebenso mit der Software EthoVision XT 15 durchgeführt. Die Analyse wurde innerhalb eines Zeitfensters von 60 Minuten durchgeführt. Vor der Analyse hatten die Tiere mindestens 60 Stunden im PhenoTyper-Käfig als Heimkäfig verbracht. Die 60-minütige Analyse wurde rund 30 Minuten nach Beginn der Dunkelphase gestartet, da die Tiere zu dieser Zeit höchste Aktivitätslevel aufwiesen. Analysiert wurden die Gesamtaktivität der Tiere über die zurückgelegte Strecke sowie die mittlere Geschwindigkeit der Tiere. Weiter wurde die Aufenthaltsdauer der Tiere in definierten Käfigzonen (Futterzone, Tränkezone, Zentrum des Käfigs) analysiert.

3.5 Open-Field-Test

Im Open-Field-Test wurden Parameter analysiert, die Aufschluss über die lokomotorische Aktivität, angstassoziiertes Verhalten und das Explorationsverhalten der Tiere geben können. Mindestens 30 Minuten vor Beginn der Experimente wurden die Tiere in ihrem Heimkäfig zur Habituation in den Testraum verbracht. Bei dem Testraum handelt es sich um einen schallgedämmten Raum im Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät, LMU München. Männliche Tiere wurden vor den weiblichen Tieren getestet. Die Tiere wurden einzeln in eine weiße runde Arena eingesetzt (Durchmesser: 60 cm, Höhe 40.5 cm; Lichtverhältnisse: 12-20 lux). Dabei wurde das Tier 10 cm entfernt von der Wand der Arena mit dem Kopf in Richtung der Arenawand eingesetzt. Der Test wurde mit zwei nebeneinander stehenden Open-Field-Arenen durchgeführt und die Tiere einer Experimentaleinheit ($n = 2$) wurden

gleichzeitig in ihre jeweilige Arena eingesetzt. Der Test dauerte ab Einsetzen der Tiere in die Arenen exakt 15 Minuten. Die Open-Field-Arenen wurden nach jedem Testdurchgang mit 0.1 % Essigsäure gesäubert, um Geruchsspuren zu entfernen. Die Aufzeichnungen und Analysen wurden mit der Software EthoVision XT 8.5 (Noldus, RRID:SCR_000441) durchgeführt. Als Parameter lokomotorischer Aktivität wurde die zurückgelegte Gesamtdistanz herangezogen. Zur Beurteilung explorativen Verhaltens wurde die Dauer bestimmt, die sich die Tiere im Wandbereich der Arena und im Zentrum der Arena aufhielten (Zonen „Wand“ und „Zentrum“). Hierfür wurde die Arena in drei Zonen unterteilt, die Wandzone (entsprechend 17% der Arena), die mittlere Zone (entsprechend 38% der Arena) und die Zentrumszone (entsprechend 45%) der Arena. Zusätzlich wurde retrospektiv anhand der Videodateien manuell gescort, wie oft sich die Tiere während der 15 Minuten aufrichteten (Position *Rearing*) und wie oft die Tiere in dieser Zeit gegen die Arenawand sprangen („Sprünge“).

3.6 Irwin-Score

Als klassischer neurologischer Verhaltenstest in der Versuchstierkunde nach Samuel Irwin (IRWIN, 1968) wurde der Irwin-Test durchgeführt, um Informationen über das Allgemeinbefinden der Tiere und die Integrität des vegetativen Nervensystems zu erhalten. Der Irwin-Test wurde in drei aufeinander folgenden Teilen durchgeführt:

1. Observation im Heimkäfig (PhenoTyper-Käfige oder Makrolon-Typ-III-Käfige)
2. Videobasierte Observation in der Open-Field-Arena
3. Observation in frischem Käfig (Makrolon-Typ-II-Käfige), ausgestattet mit Einstreumaterial (Lignocel Select).

Die Testreihenfolge richtete sich nach der Invasivität der Parameter. *Handling*-assoziierte Parameter wurden zum Schluss getestet. Als letzter Parameter wurde rektal die Körpertemperatur der Tiere gemessen. Im Anhang befindet sich eine detaillierte Beschreibung der Parameter und des verwendeten Punktesystems.

3.7 Wärmebildbasierte Wurfüberwachung

Ein Muttertier mit ihren sechs Jungtieren wurde an P16 in einen PhenoTyper-Käfig transferiert, der den Tieren von nun an als Heimkäfig diene. Die Genotypisierung der Tiere mit Probenmaterial, das an P19 entnommen wurde, ergab, dass es sich bei den sechs Jungtieren um zwei weibliche und vier männliche *Scn1a*^{+/-} Tiere handelte. Jeder PhenoTyper-Käfig war ausgestattet mit 200 g Einstreumaterial +/- 5 g (Lignocel Select), zwei Nestlets (Ancare), einem viereckigen Maushaus (Noldus) und zwei Trinkflaschen (Noldus). Die Haltung im PhenoTyper-Käfig wurde über das Micro-Wärmebild-Kameramodul FLIR Lepton 3.5 (Teledyne FLIR LLC, Wilsonville, USA), kombiniert mit dem USB-Webcam-Breakout-Board *PureThermal 2* Smart-I/O-Board (Teledyne FLIR LLC, Wilsonville, USA), mit kontinuierlicher Wärmebildvideoaufzeichnung überwacht. Das Wärmebild-Kameramodul wurde angesteuert über die Lepton User App für Windows (Teledyne FLIR LLC, Wilsonville, USA). Die Wärmebildvideoüberwachung wurde als kontinuierliche Aufzeichnung von P16 bis P19 durchgeführt, um Informationen über die Interaktion der Tiere im Heimkäfig sowie Separation einzelner Tiere und Anzeichen reduzierten maternalen Verhaltens zu erhalten. Die Auswertung sollte im Rahmen des Pilotprojekts auf deskriptiver Basis stattfinden.

4. Fäkale Kortikosteronmetaboliten

Kotproben für die Analyse der Kortikosteronmetaboliten wurden direkt im Anschluss an den Open-Field-Test gesammelt. Im C57BL/6-Projekt wurden die Kotproben im Laufe des Vormittags (6:00 bis 10:00 Uhr MEZ und 7:00 bis 11:00 Uhr MESZ) gesammelt. Im *Scn1a-A1783V* und im *Grial*-Projekt wurden die Kotproben zwischen 7:00 und 13:00 Uhr (MESZ) gesammelt. Die Kotproben wurden als Einzeltierproben jeweils direkt aus der Open-Field-Arena nach Durchführung des Tests gesammelt. Um genügend Probenmaterial zu erhalten, wurde Kot auch aus den Einzelkäfigen (Makrolon-Typ-II-Käfige), ausgestattet mit Einstreumaterial (Lignocel Select), gesammelt. Die Proben aus den Einzelkäfigen wurden gesammelt, nachdem die Tiere zwei Stunden in den Käfigen gesessen hatten. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert. Zur Aufbereitung für die Analyse wurden die Proben getrocknet, homogenisiert und aliquotiert (Einwaage: 0.05 g getrocknetes, homogenisiertes Probenmaterial). Danach erfolgte die Extraktion mit

1 ml 80%igem Methanol (PALME et al., 2013). Die Proben wurden auf Trockeneis an das Institut für Medizinische Biochemie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Wien, verschickt. Dort erfolgte die Bestimmung der Metabolitkonzentrationen. Hierfür wurde ein 5α -pregnan- 3β , 11β , 21 -triol- 20 - 1 Enzym-Immunoassay verwendet. Dieser Immunoassay ist zur Bestimmung fäkaler Kortikosteronmetaboliten bei Mäusen validiert (TOUMA et al., 2003; TOUMA et al., 2004).

5. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit den Programmen R Version 4.0.2 und Version 4.1.2 (R CORE TEAM, 2020) und GraphPad Prism Version 5.04 für Windows (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Daten der C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, des *Scn1a*-A1783V-Modells und des *Gria1*-Modells wurden mittels parametrischer zwei-faktorieller Varianzanalyse (ANOVA) oder nichtparametrischer Varianzanalyse (ART „Aligned Rank Transform“ ANOVA (Wobbrock 2011, Elkin 2021)) mit dem ARTool Version 2.1.2 (Washington, DC, USA) analysiert. Hierbei wurde auf signifikante Effekte der Haupteffektgrößen *Alter* und *Geschlecht* (C57BL/6-Wildtyp-Mäuse) oder *Genotyp* und *Geschlecht* (*Scn1a*-A1783V-Modell, *Gria1*-Modell) geprüft. Die multifaktorielle Analyse ermöglichte auch die Prüfung der Interaktion der Haupteffekte: Daten weiblicher und männlicher Tiere wurden separat ausgewertet und dargestellt, wenn dies durch eine signifikante Interaktion des Geschlechts mit dem jeweils zweiten Haupteffekt begründet werden konnte (BUCH et al., 2019). Ansonsten wurden die Daten weiblicher und männlicher Tiere einer Versuchsgruppe zusammengefasst. Signifikante Haupteffekte der Multivarianzanalyse der Daten der C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, des *Scn1a*-A1783V-Modells und des *Gria1*-Modells wurden mittels *post-hoc*-Test korrigiert, um dem Risiko der Alpha-Fehler-Kumulierung zu begegnen: *False-Discovery-Rate*-Analyse nach Benjamini-Hochberg (FDR-Korrektur), Bonferroni-Korrektur, *Tukey's HSD* oder *Dunn's post-hoc*-Test. Ein *p*-Wert < 0.05 wurde für alle statistischen Analysen als signifikant angenommen.

Die Datensätze der C57BL/6J Wildtyp-Mäuse, des *Scn1a*-A1783V-Modells und des *Gria1*-Modells wurden jeweils Korrelationsanalysen nach Spearman unterzogen (CULHANE et al. 2005). Bei der Korrelationsanalyse nach Spearman wurde eine

signifikante Korrelation für $r < -0.5$ oder $r > 0.5$ jeweils in Verbindung mit $p < 0.05$ angenommen. Die *Heatmap*-Darstellung der Korrelationsanalysen erfolgte mit dem R-Paket „corrplot“ (WEI & SIMKO, 2021). Die graphischen Darstellungen der Hauptkomponentenanalysen (PCA) der Datensätze der C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, des *Scn1a*-A1783V-Modells und des *Gria1*-Modells erfolgten mit dem R-Paket ggplot2 (WICKHAM, 2016). Die graphischen Darstellungen wurden mit den Programmen GraphPad Prism Version 5.04 und R Version 4.1.2 (R CORE TEAM, 2020) durchgeführt. Daten, die mittels parametrischer Statistik ausgewertet wurden, sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (Mittelwert \pm SEM) dargestellt. Daten, die mit nichtparameterischer Statistik analysiert wurden, werden als Median mit Interquartilrange (Median (IQR)) gezeigt.

IV. ERGEBNISSE

1. C57BL/6 Wildtyp-Mäuse

Saccharinpräferenz

Die Analyse der Saccharinpräferenz zeigte einen signifikanten Effekt des Alters auf die von den Tieren über den Gesamtzeitraum des Versuchs aufgenommene Menge an Saccharinlösung (Abb. 5, ANOVA, $F_{4,89}=4.73$, $p = 0.002$). Reif adulte Tiere (P120) zeigten eine signifikant geringere Präferenz für Saccharin als präpubertäre Tiere (P25) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.05$) und pubertäre Tiere (P36) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.05$). Ein Einfluss des Geschlechts auf den Saccharingesamtkonsum sowie eine Interaktion zwischen Geschlecht und Alter wurden nicht festgestellt.

Wühlverhalten

Die Analyse des Wühlverhaltens der Tiere während der Dunkelphase zeigte, dass sowohl das Alter als auch das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die Menge des Wühlsubstrats im ersten und im zweiten Dunkelphasen-Test hatten (Abb. 5, ANOVAs: Test 1: Alter $F_{4,90} = 12.44$, $p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,90} = 8.25$, $p = 0.005$; Test 2: Alter $F_{4,90} = 13.70$, $p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,90} = 10.09$, $p = 0.002$). Eine Interaktion zwischen den zwei Haupteffekten konnte weder am ersten noch am zweiten Testtag festgestellt werden. Im ersten Test während der Dunkelphase wühlten präpubertäre Tiere (P25) eine signifikant geringere Menge als die älteren Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P36 $p < 0.05$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.0001$, P120 $p < 0.01$). Pubertäre Tiere (P36) wühlten im ersten Dunkelphasentest zudem eine geringere Menge als jung adulte Tiere (P65) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.05$). Während der zweiten Dunkelphase wühlten präpubertäre Tiere (P25) ebenfalls eine signifikant geringere Menge als die älteren Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P36 $p < 0.05$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.0001$, P120 $p < 0.001$). Pubertäre Tiere (P36) wühlten auch im zweiten Dunkelphasentest eine geringere Menge als jung adulte Tiere (P65) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.05$). Die Analyse zur Erfassung der Wühlleistung in der Hellphase während des zweistündigen Zeitfensters ergab keine Gruppenunterschiede während des ersten Testtags (Abb. 5). Am darauffolgenden zweiten Testtag konnte ein signifikanter Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Menge des gewühlten Substrats innerhalb von 120 Minuten detektiert werden, dabei interagierten die Haupteffekte nicht miteinander (Abb. 5, ANOVA: Alter $F_{4,90} = 3.79$, $p = 0.007$, Geschlecht

$F_{1,90} = 6.59, p = 0.01$): im zweiten Hellphasen-Test wählten präpubertäre Tiere (P25) eine geringere Substratmenge als jung adulte Tiere (P65) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.05$).

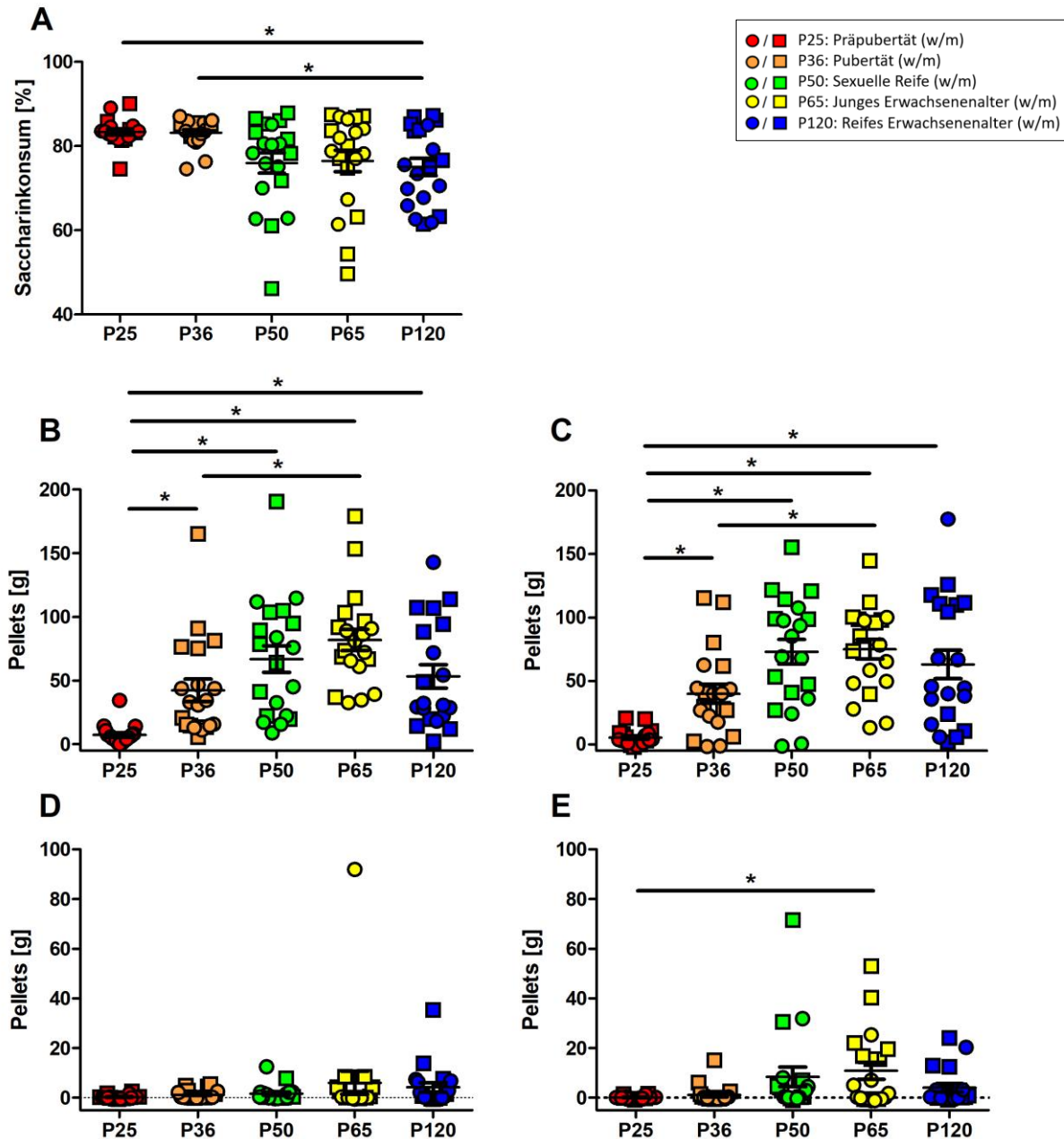


Abbildung 5. Saccharinpräferenz und Wühlverhalten. Präpubertäre (P25) und pubertäre (P36) Tiere zeigten eine höhere Präferenz von Saccharin gegenüber Wasser als reif adulte Tiere (P120) (A). Während die Analyse des Wühlverhaltens über das Gewicht des Wühlsubstrats (Pellets) in der Dunkelphase am ersten Testtag (B) sowie am zweiten Testtag (C) mehrere Gruppenunterschiede aufzeigte, zeigten die Analyse des ersten (D) und zweiten (E) 120-minütigen Hellphasen-Test ein geringer ausgeprägtes Wühlverhalten auf. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. $n = 9-10$ pro Altersgruppe pro Geschlecht. * $p < 0.05$. ANOVA mit Bonferroni-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

Nestbauverhalten

Die Analyse des Nestbauverhaltens an den einzelnen Untersuchungstagen zeigte einen Einfluss des Alters der Tiere auf den Komplexitätsscore an allen Tagen außer am vierten und fünften Untersuchungstag (Abb. 6, ART ANOVAs: Tag 1 Alter $F_{4,90} = 3.30$, $p = 0.01$; Tag 2 Alter $F_{4,90} = 3.42$, $p = 0.01$; Tag 3 Alter $F_{4,90} = 3.2$, $p = 0.02$; Tag 4 Alter $F_{4,90} = 2.11$, $p = 0.09$; Tag 5 Alter $F_{4,90} = 0.76$, $p = 0.6$; Tag 6 Alter $F_{4,90} = 2.79$, $p = 0.03$). Ein Unterschied zwischen den Altersgruppen konnte im *post-hoc*-Test jedoch nur am dritten Untersuchungstag bestätigt werden: unabhängig vom Geschlecht der Tiere erreichten die Nester sexuell reifer Tiere (P50) höhere Scores als die Nester jung adulter Tiere (P65) am dritten Untersuchungstag (Abb. 6, *Dunn's post-hoc*-Test: $p < 0.05$). Eine signifikante Interaktion des Alters mit dem Geschlecht wurde an keinem der Untersuchungstage festgestellt. Unabhängig vom Alter der Tiere erreichten die Nester weiblicher Tiere an allen Untersuchungstagen einen höheren Komplexitätsscore als die männlicher Tiere (Abb. 6, ART ANOVAs: Tag 1 Geschlecht $F_{1,90} = 46.52$, $p < 0.0001$, Tag 2 Geschlecht $F_{1,90} = 48.33$, $p < 0.0001$, Tag 3 Geschlecht $F_{1,90} = 44.88$, $p < 0.0001$, Tag 4 Geschlecht $F_{1,90} = 24.02$, $p < 0.0001$, Tag 5 Geschlecht $F_{1,90} = 21.60$, $p < 0.0001$; Tag 6 Geschlecht $F_{1,90} = 24.92$, $p < 0.0001$).

Die Analyse des Summenscores, der sich aus der Addition der über die einwöchige Untersuchungsphase erzielten Tagesscores ergibt, zeigte einen signifikanten Effekt des Alters und des Geschlechts auf die Nestkomplexität, wobei beide Haupteffekte nicht interagierten (Abb. 6, ART ANOVA: Alter $F_{4,90} = 3.81$, $p = 0.007$, Geschlecht $F_{1,90} = 73.45$, $p < 0.0001$): unabhängig vom Alter der Tiere erreichten die Nester weiblicher Tiere höhere Summenscores als die Nester männlicher Tiere. Ein Unterschied der Summenscores zwischen den Altersgruppen konnte im *post-hoc*-Test nicht bestätigt werden.

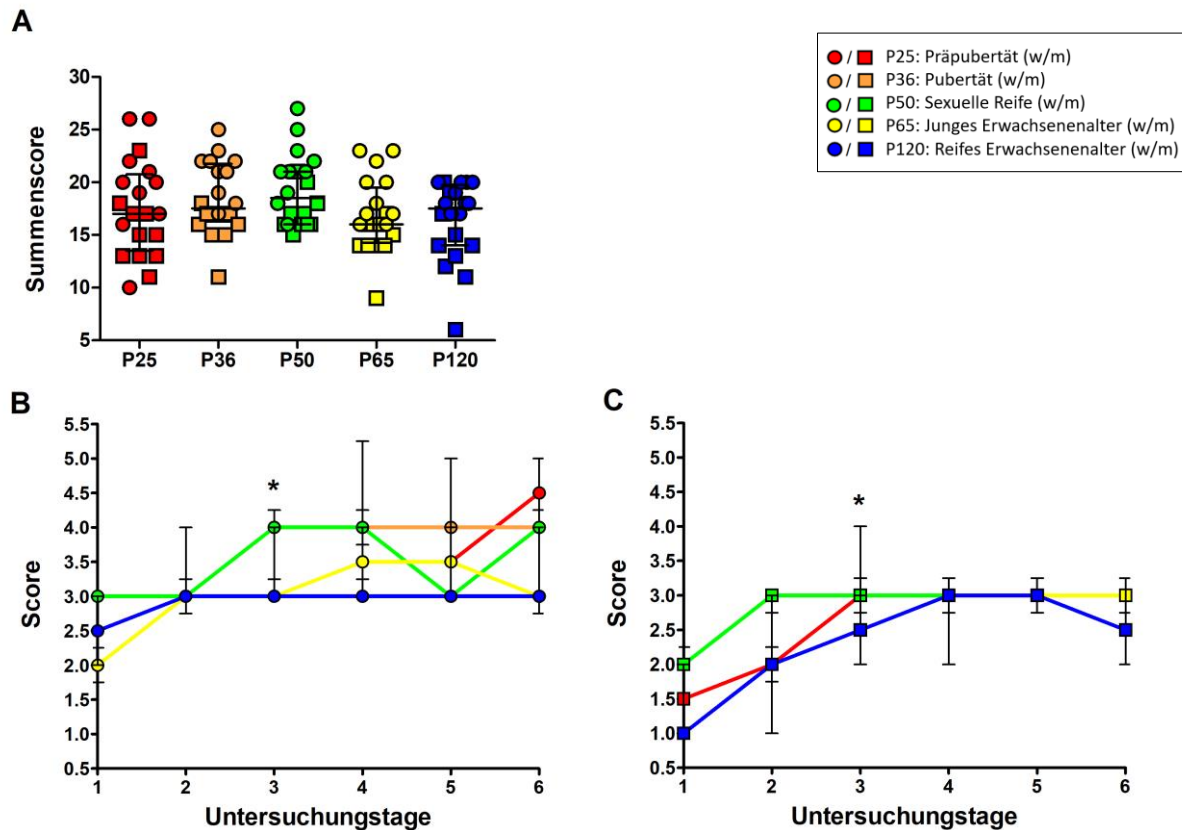


Abbildung 6. Nestbauverhalten. Die Analyse des Summenscores, der sich aus der Addition der Einzelscores der sechs Untersuchungstage ergibt, konnte keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen zeigen (A). Unabhängig vom Alter der Tiere wurden die Nester weiblicher Tiere (B) an allen sechs Untersuchungstagen mit signifikant höheren Scores bewertet als die Nester männlicher Tiere (C). Unabhängig vom Geschlecht der Tiere erreichten die Nester sexuell reifer Tiere (P50) am dritten Untersuchungstag höhere Scores als die Nester jung adulter Tiere (P65). Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. Die getrenntgeschlechtliche Darstellung (B, C) erfolgte trotz nicht signifikanter Interaktion der beiden Haupteffektgrößen und dient der besseren Übersichtlichkeit. $n = 10$ pro Altersgruppe pro Geschlecht. ART ANOVA mit *Dunn's post-hoc-Test*; Median mit IQR.

Laufaktivität

Die Analyse der Laufaktivität innerhalb der viertägigen Untersuchungsperiode demonstrierte einen signifikanten Effekt von Alter und Geschlecht auf die zurückgelegte Gesamtdistanz, wobei beide Haupteffekte nicht signifikant miteinander interagierten (Abb. 7, ANOVAs: Alter $F_{4,90} = 22.78$, $p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,90} = 69.01$, $p < 0.0001$). Präpubertäre Tiere (P25) legten eine geringere Gesamtdistanz zurück als pubertäre Tiere (P36), sexuell reife Tiere (P50) und jung adulte Tiere (P65) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.01$, resp. $p < 0.0001$, resp. $p < 0.01$). Sexuell reife Tiere (P50) legten zudem eine größere Distanz zurück als reif adulte Tiere (P120) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.001$). Unabhängig vom Alter legten weibliche Tiere eine größere Gesamtdistanz zurück als männliche Tiere. Die Analyse der zurückgelegten

Distanz innerhalb von 24 Stunden ergab, dass das Alter und das Geschlecht signifikante Effekte auf die zurückgelegte Distanz an allen vier Untersuchungstagen hatte (Abb. 7). An Tag 2 konnte zusätzlich eine Interaktion zwischen Alter und Geschlecht festgestellt werden (Abb. 7, ANOVA: Interaktion Alter x Geschlecht $F_{4,90} = 2.62$, $p = 0.04$): die Analyse der Laufleistung weiblicher Tiere an Tag 2 zeigte, dass weibliche Tiere im präpubertären Alter (P25) eine geringere Strecke zurücklegten als alle älteren weiblichen Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P36 $p < 0.001$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.0001$, P120 $p < 0.01$). Zudem legten weibliche sexuell reife Tiere (P50) an Tag 2 eine größere Strecke im Laufrad zurück als jung adulte (P65) und reif adulte (P120) Tiere gleichen Geschlechts (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.05$, resp. $p < 0.001$). Die Analyse innerhalb der Gruppen männlicher Tiere demonstrierte, dass sexuell reife (P50) männliche Tiere eine größere Strecke an Tag 2 im Laufrad zurücklegten als die präpubertäre (P25) und reif adulte Vergleichsgruppe (P120) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.01$, resp. $p < 0.01$).

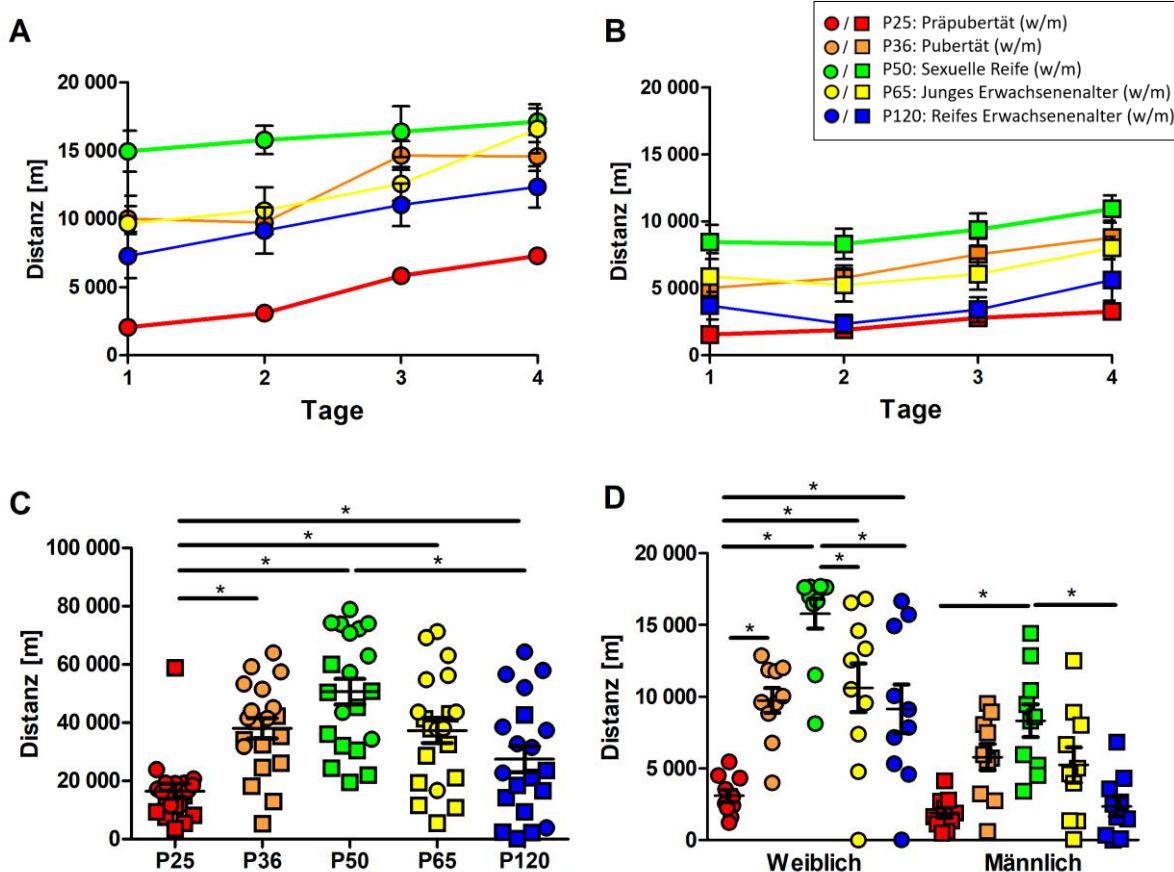


Abbildung 7. Laufradaktivität. Die Analyse der von den Tieren über den viertägigen Untersuchungszeitraum zurückgelegte Distanz zeigte, dass weibliche Tiere (A) unabhängig vom Alter eine größere Distanz zurücklegten als männliche Tiere (B). Die Analyse der von den Tieren zurückgelegten Gesamtdistanz (C) zeigte Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Die Analyse der Distanz, die am zweiten Untersuchungstag von den Tieren zurückgelegt wurde

(D), konnte geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen den Altersgruppen zeigen. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. $n = 10$ pro Altersgruppe pro Geschlecht. * $p < 0.05$. ANOVA mit Bonferroni-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

Open-Field-Test

Die Analyse der ersten fünf Minuten nach Einsetzen der Tiere in die neue Umgebung der Arena kann Information über das Explorationsverhalten der Tiere liefern. Die Aufenthaltsdauer in der Zentrumszone der Arena unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (Abb. 8). Die Analyse der Aufenthaltsdauer in der Wandzone der Arena zeigte einen signifikanten Effekt des Alters und des Geschlechts sowie eine signifikante Interaktion beider Haupteffekte (Abb. 8, ANOVA: Alter $F_{4,190} = 20.73, p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,90} = 6.86, p = 0.01$, Alter x Geschlecht Interaktion $F_{4,190} = 2.88, p = 0.02$). Tiere des männlichen Geschlechts hielten sich im präpubertären Alter (P25) länger im Wandbereich der Arena auf als im jung adulten (P65) und reif adulten (P120) Alter (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.0001$, resp. $p < 0.001$). Pubertäre (P36) männliche Tiere hielten sich zudem länger im Bereich der Arenawand auf als jung adulte (P65) und reif adulte (P120) männliche Tiere (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.001$, resp. $p < 0.01$). Die Analyse innerhalb des weiblichen Geschlechts zeigte, dass reif adulte (P120) Tiere eine kürzere Aufenthaltsdauer im Wandbereich aufwiesen als alle jüngeren weiblichen Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P25 $p < 0.0001$, P36 $p < 0.0001$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.01$).

Die Analyse der zurückgelegten Distanz und Fortbewegungsgeschwindigkeit innerhalb der Gesamtexpositionszeit von 15 Minuten kann Aufschluss über das Lokomotionsverhalten der Tiere geben. Die Hauptfaktoren Alter und Geschlecht hatten einen signifikanten Einfluss auf die zurückgelegte Distanz der Tiere, interagierten aber nicht miteinander (Abb. 8, ANOVA: Alter $F_{4,190} = 8.27, p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,190} = 4.11, p = 0.04$). Unabhängig vom Geschlecht legten präpubertäre (P25) Tiere eine geringere Distanz zurück als alle älteren Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P36 $p < 0.01$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.0001$, P120 $p < 0.01$). Dies spiegelte sich auch in der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Tiere (Distanz pro 15 Minuten) wider (Anova: Alter $F_{4,190} = 8.26, p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,190} = 4.11, p = 0.04$): Unabhängig vom Geschlecht bewegten sich präpubertäre Tiere (P25) mit geringerer Geschwindigkeit fort als alle älteren Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P36 $p < 0.01$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.0001$, P120 $p < 0.01$). Mit Blick auf die von den Tieren während der Gesamtexpositionszeit von 15 Minuten gezeigten *Rearing*-Positionen konnte ein signifikanter Effekt des Alters demonstriert werden (Abb. 8, ANOVA: Alter $F_{4,190} = 28.61, p < 0.0001$).

Präpubertäre Tiere (P25) richteten sich weniger häufig auf den Hinterbeinen auf als alle älteren Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P36 $p < 0.001$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.0001$, P120 $p < 0.0001$). Zudem richteten sich pubertäre Tiere (P36) weniger häufig auf als alle älteren Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.01$, P120 $p < 0.001$). Die Analyse der Anzahl der Sprünge der Tiere gegen die Arenawand zeigte einen signifikanten Effekt des Alters (Abb. 8, ANOVA: Alter $F_{4,190} = 2.98$, $p = 0.02$): präpubertäre Tiere (P25) sprangen während der Gesamtexpositionszeit von 15 Minuten weniger häufig gegen die Arenawand als pubertäre Tiere (P36) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.05$).

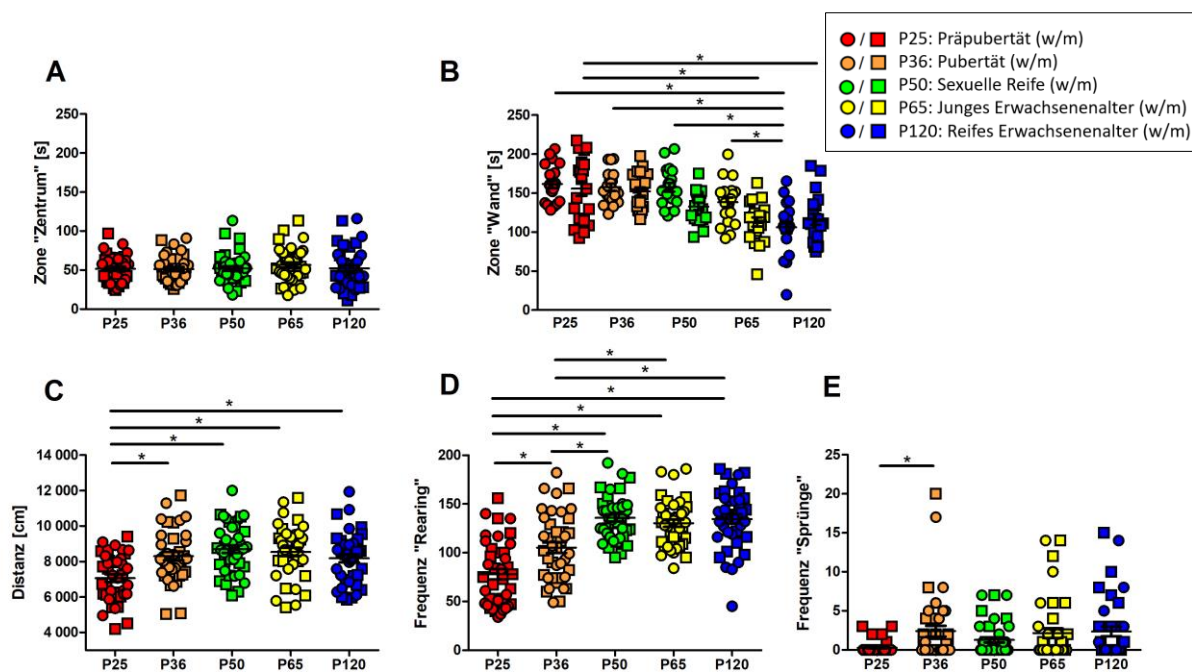


Abbildung 8. Open-Field-Test. Die Analyse innerhalb der ersten fünf Minuten zeigte, dass die Aufenthaltsdauer der Tiere in der Zentrumszone (A) nicht zwischen den Altersgruppen unterschied, wohingegen geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen den Altersgruppen hinsichtlich der in der Wandzone (B) verbrachten Zeit festgestellt wurden. Die Analyse der gesamten Testdauer von 15 Minuten zeigte Unterschiede zwischen den Altersgruppen hinsichtlich der zurückgelegten Gesamtdistanz (C) sowie des erfassten *Rearing*-Verhaltens (D) und der erfassten Sprünge gegen die Arenawand (E) auf. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. $n = 20$ pro Altersgruppe pro Geschlecht. * $p < 0.05$. ANOVA mit Bonferroni-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

Irwin-Score

Die Analyse der Summenscores konnte einen signifikanten Effekt des Alters demonstrieren (Abb. 9, ART ANOVA: Alter $F_{4,190} = 2.82$, $p = 0.03$), jedoch konnte ein signifikanter Gruppenunterschied im *post-hoc*-Test nicht bestätigt werden. Des Weiteren konnte die Analyse der Summenscores keinen signifikanten Effekt des Geschlechts und keine signifikante Interaktion zwischen den beiden Haupteffektgrößen demonstrieren. Alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede wurden bei der Erfassung der Körpertemperatur der Tiere detektiert (Abb. 9, ART ANOVA: Alter $F_{4,188} = 10.51$, $p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,188} = 95.86$, $p < 0.0001$, Interaktion Alter x Geschlecht $F_{4,188} = 8.29$, $p < 0.0001$). Hierbei zeigte die Analyse der Daten weiblicher Tiere, dass jung adulte Tiere (P65) eine geringere Körpertemperatur aufwiesen als pubertäre (P36), sexuell reife (P50) und reif adulte (P120) Tiere (*Dunn's post-hoc*-Test: $p < 0.001$, resp. $p < 0.01$, resp. $p < 0.05$). Die Analyse der Daten männlicher Tiere ergab, dass reif adulte Tiere (P120) niedrigere Körpertemperaturen aufwiesen als präpubertäre (P25), pubertäre (P36) und sexuell reife (P50) Tiere (*Dunn's post-hoc*-Test: $p < 0.001$, resp. $p < 0.001$, resp. $p < 0.01$). Jung adulte männliche Tiere (P65) wiesen erniedrigte Körpertemperaturen auf im Vergleich zu pubertären männlichen Tieren (P36) (*Dunn's post-hoc*-Test: $p < 0.05$).

Fäkale Kortikosteronmetaboliten (FCM)

Die Analyse fäkaler Kortikosteronmetaboliten ergab einen signifikanten Effekt des Alters und des Geschlechts auf die Metabolitkonzentrationen und zeigte eine signifikante Interaktion der Haupteffekte (Abb. 9, ANOVA: Alter $F_{4,190} = 19.20$, $p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,90} = 19.49$, $p < 0.0001$, Alter x Geschlecht Interaktion $F_{4,190} = 3.26$, $p = 0.01$). Die Analyse innerhalb des weiblichen Geschlechts ergab erhöhte Metabolitkonzentrationen in präpubertären Tieren (P25) gegenüber pubertären Tieren (P36) und reif adulten Tieren (P120) (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.01$, resp. $p < 0.01$). Die Analyse innerhalb des männlichen Geschlechts zeigte erhöhte Metabolitspiegel in präpubertären Tieren (P25) im Vergleich zu allen älteren Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P36 $p < 0.0001$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.0001$, P120 $p < 0.0001$). Geschlechtsunterschiede zeigten sich in sexuell reifen (P50), jung adulten (P65) und reif adulten (P120) Tieren: weibliche Tiere wiesen höhere Metabolitkonzentrationen auf als männliche Tiere (Bonferroni-Korrektur: P50 $p < 0.01$, P65 $p < 0.01$, P120 $p < 0.05$).

Körpergewicht

Die Auswertung der Körpergewichtsdaten der Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn (Tag 1) demonstrierte einen signifikanten Effekt von Alter und Geschlecht auf das Körpergewicht sowie eine signifikante Interaktion der beiden Haupteffekte (Abb. 9, ANOVA Alter $F_{4,190} = 491.0$, $p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,190} = 32.01$, Alter x Geschlecht Interaktion $F_{4,90} = 32.01$, $p < 0.0001$). Die Analyse innerhalb des weiblichen Geschlechts zeigte, dass präpubertäre Tiere (P25) signifikant geringere Körpergewichte aufwiesen als die älteren Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P36 $p < 0.0001$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.0001$, P120 $p < 0.0001$). Zudem hatten weibliche pubertäre Tiere (P36) ein geringeres Körpergewicht als weibliche reif adulte (P120) Tiere (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.001$). Die Analyse innerhalb des männlichen Geschlechts zeigte, dass präpubertäre Tiere (P25) signifikant geringere Körpergewichte aufwiesen als die älteren Vergleichsgruppen (Bonferroni-Korrektur: P36 $p < 0.0001$, P50 $p < 0.0001$, P65 $p < 0.0001$, P120 $p < 0.0001$). Zudem hatten männliche pubertäre Tiere (P36) ein geringeres Körpergewicht als männliche jung adulte (P65) und reif adulte (P120) Tiere (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.01$, resp. $p < 0.001$).

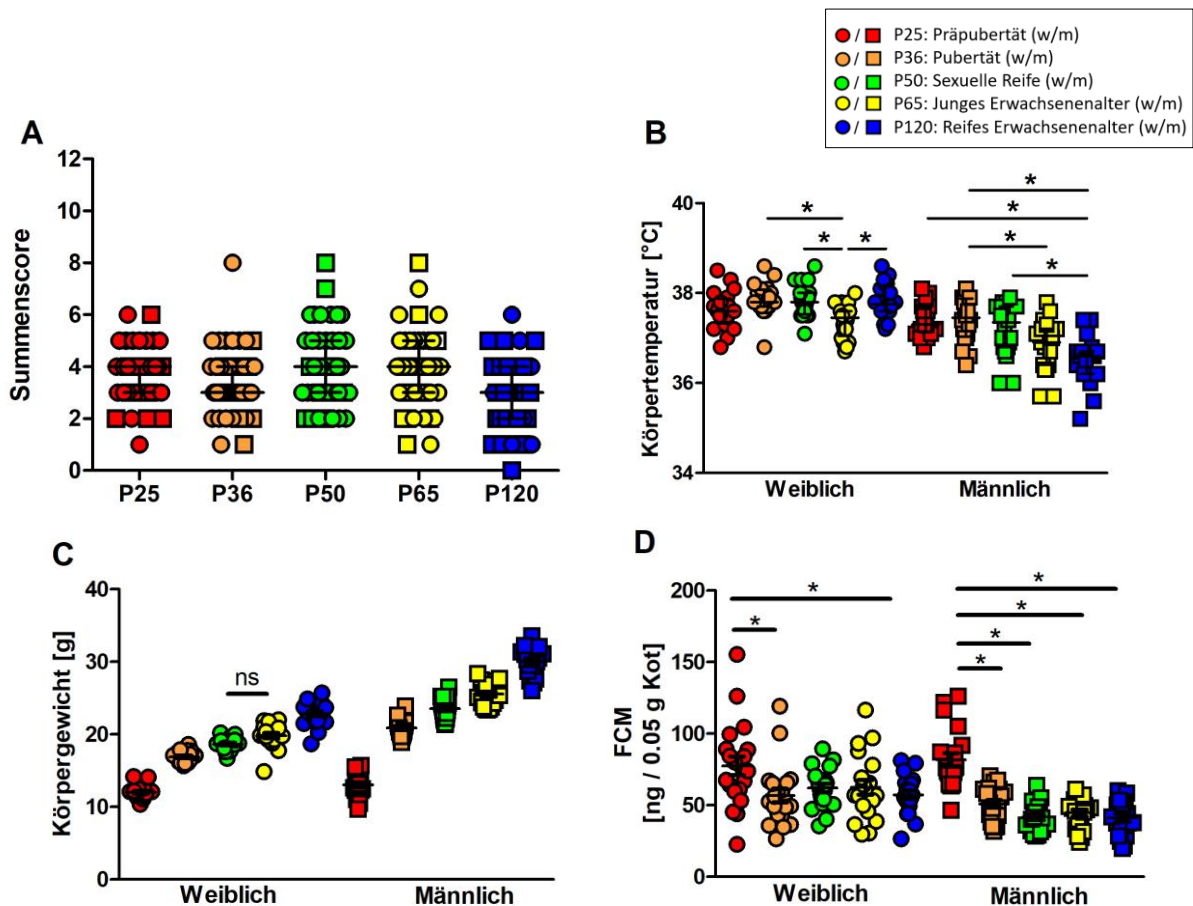


Abbildung 9. Irwin-Score, Körpertemperatur, Körpergewicht und fäkale Kortikosteronmetaboliten (FCM). Die Analyse des Irwin-Summscores (A) konnte keine Gruppenunterschiede zeigen. Der Summscore ergibt sich aus der Addition aller Einzelscores. Die Analyse der Körpertemperatur der Tiere (B) demonstrierte geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Ein signifikanter Gewichtsunterschied (C) wurde zwischen allen weiblichen Altersgruppen und allen männlichen Altersgruppen festgestellt, außer zwischen weiblichen sexuell reifen (P50) und weiblichen jung adulten (P65) Tieren (ns). Kortikosteronmetabolitkonzentrationen im Kot der Tiere (D) unterschieden sich geschlechtsspezifisch zwischen den Altersgruppen. Bei sexuell reifen (P50), jung adulten (P65) und reif adulten (P120) Tieren wiesen Proben weiblicher Tiere höhere Metabolitkonzentrationen auf als die der männlichen Tiere. $n = 20$ pro Altersgruppe pro Geschlecht. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. In Abb. C sind Signifikanzen aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. ART ANOVA (A, B) oder ANOVA (C, D) mit *Dunn's post-hoc*-Test (A, B) oder Bonferroni-Korrektur; Median (IQR) (A, B) oder Mittelwert \pm SEM (C, D).

2. *Scn1a*-A1783V-Modell

Saccharinpräferenz

Die Analyse der Saccharinpräferenz zeigte bei präpubertären Tieren keine Gruppenunterschiede auf (Abb. 10). Bei sexuell reifen Tieren wurde ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die Präferenz für Saccharin detektiert, wobei beide Haupteffektgrößen nicht interagierten (Abb. 10, ANOVA: Genotyp $F_{1,13} = 23,12$, $p = 0.0003$, FDR-korrigiertes $p = 0.02$, Geschlecht $F_{1,13} = 5.70$, $p = 0.03$, FDR-korrigiertes $p = 0.1$). Hierbei zeigte sich, dass sexuell reife *Scn1a*^{+/-} Mäuse eine geringere Präferenz für Saccharin aufwiesen als ihre *Scn1a* WT Wurfgeschwister.

Im Rahmen der Untersuchungen bei sexuell reifen Tieren zeigten vier männliche und zwei weibliche *Scn1a* WT Tiere stereotype Verhaltensveränderungen des Trinkverhaltens: so „nippten“ die Tiere an den Flaschen und leerten diese, ohne die ausströmende Flüssigkeit zu trinken. Die nasse Einstreu unter den Flaschen wurde jeweils morgens entfernt und durch frische Einstreu ersetzt. Die betreffenden sechs *Scn1a* WT Tiere wurden von der Analyse der Saccharinpräferenz ausgeschlossen.

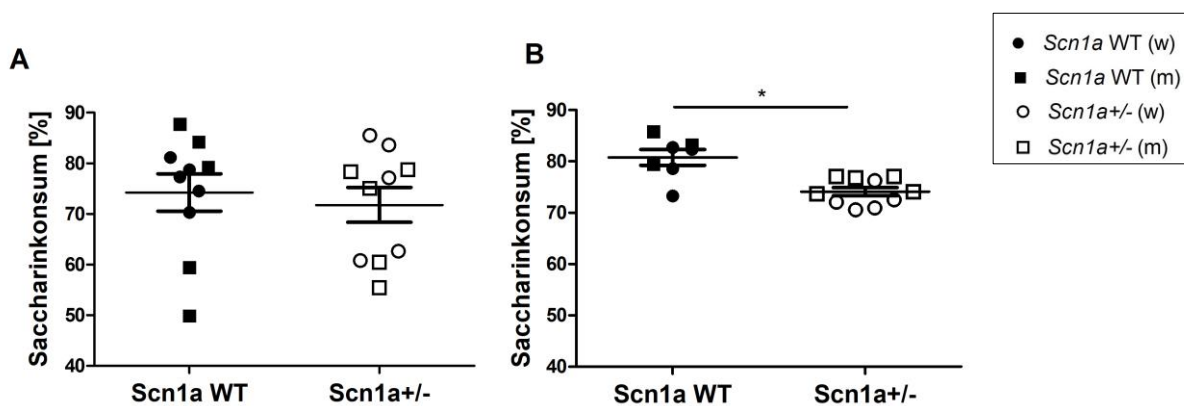


Abbildung 10. Saccharinpräferenz. Die Analyse der Präferenz für Saccharin gegenüber Wasser zeigte keine Gruppenunterschiede bei präpubertären Tieren (A) auf, während bei sexuell reifen *Scn1a* WT Tieren eine höhere Saccharinpräferenz detektiert wurde als bei *Scn1a*^{+/-} Tieren. $n = 3-5$ pro Altersgruppe pro Geschlecht. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. ANOVA mit FDR-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

Wühlverhalten

Die Analyse des Wühlverhaltens ergab einen signifikanten Effekt des Genotyps und Geschlechts auf die während des ersten Dunkelphasentests von den Tieren gewählte Substratmenge und es konnte eine signifikante Interaktion beider Haupteffektgrößen detektiert werden (Abb. 11, ANOVA: Genotyp $F_{1,16} = 30.45$, $p < 0.0001$, Geschlecht $F_{1,16} = 7.04$, $p = 0.02$, Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,16} = 6.60$, $p = 0.02$): während die Analyse im ersten Dunkelphasentest bei weiblichen Tieren keine Gruppenunterschiede zeigte, wühlten männliche *Scn1a*^{+/-} Tiere eine geringere Substratmenge als männliche *Scn1a* WT Wurfgeschwister (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.0001$). Im zweiten Test in der darauffolgenden Dunkelphase wurde ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die gewählte Substratmenge detektiert, wohingegen ein Effekt des Geschlechts und eine Interaktion der Haupteffektgrößen nicht bestätigt werden konnten (Abb. 11, ANOVA, Genotyp $F_{1,16} = 11.21$, $p = 0.004$, FDR-korrigiertes $p = 0.02$): *Scn1a*^{+/-} Tiere wühlten im zweiten Dunkelphasen-Test eine geringere Menge des Substrats als *Scn1a* WT Wurfgeschwister. Die Analyse der Wühlaktivität während der Hellphase konnte weder im ersten noch im zweiten 120-minütigen Test Gruppenunterschiede detektieren (Abb. 11).

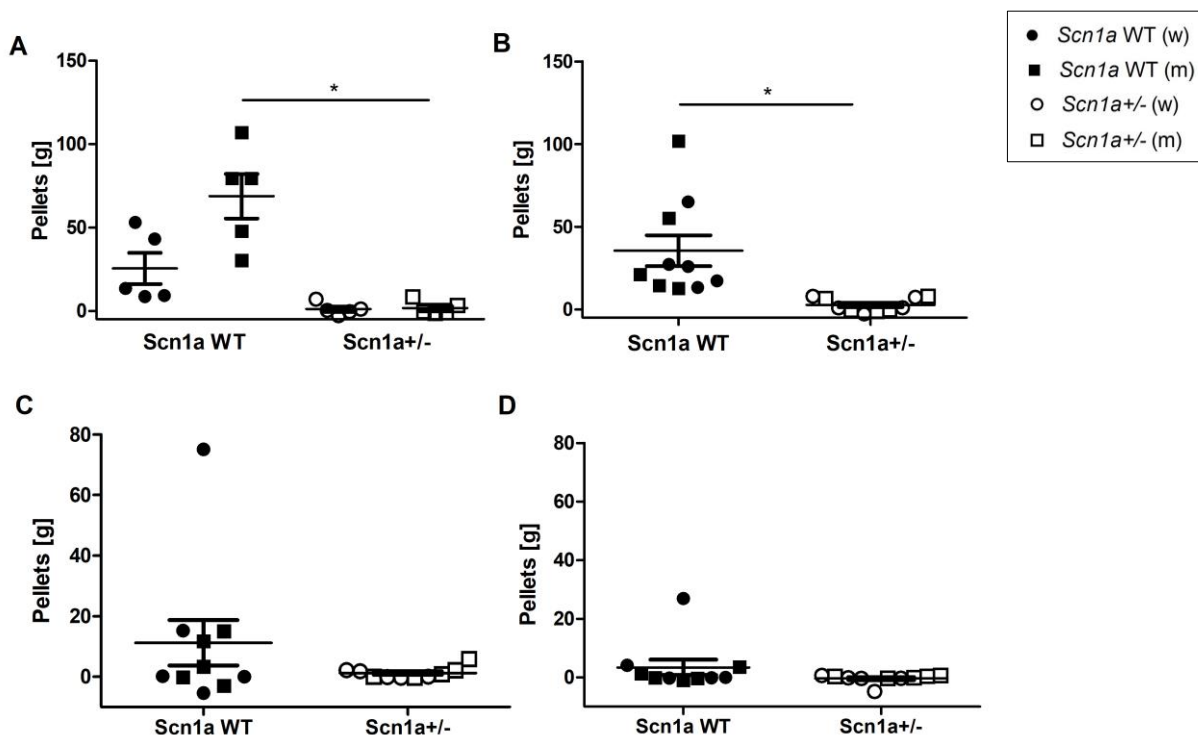


Abbildung 11. Wühlverhalten. Die Analyse des Wühlverhaltens während der Dunkelphase zeigte eine geschlechtsspezifische Reduktion der gewählten Substratmenge (Pellets) im ersten Test (A), während im Test in der darauffolgenden Dunkelphase (B) bei den *Scn1a*^{+/-} Tieren unabhängig vom Geschlecht eine geringe Substratmenge als bei *Scn1a* WT Tieren detektiert

wurde. Die Analyse der Wühlaktivität im ersten (C) und zweiten (D) Hellphasentest ergab keine Gruppenunterschiede. Tiere. $n = 5$ pro Altersgruppe pro Geschlecht. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. ANOVA mit Bonferroni-Korrektur (A) oder FDR-Korrektur (B); Mittelwert \pm SEM.

Nestbauverhalten

Die Analyse des Nestbauverhaltens bei präpubertären Tieren zeigte am ersten und zweiten Untersuchungstag nach Nestmaterialgabe keine Gruppenunterschiede (Abb. 12). An Tag 3 wurde ein signifikanter Effekt des Geschlechts auf den Komplexitätsscore detektiert (Abb. 12, ART ANOVA: Geschlecht $F_{1,16} = 9.00$, $p = 0.008$, FDR-korrigiertes $p = 0.048$): die Nester weiblicher Tiere wurden mit höheren Punktzahlen bewertet als die männlicher Tiere. An Tag 4 wurde ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die Nestkomplexität detektiert, wobei beide Haupteffekte nicht interagierten (Abb. 12, ART ANOVA: Genotyp $F_{1,16} = 24.43$, $p = 0.0001$, FDR-korrigiertes $p = 0.001$, Geschlecht $F_{1,16} = 7.18$, $p = 0.02$, FDR-korrigiertes $p = 0.07$): Nester von *Scn1a*^{+/-} Tieren wiesen eine geringere Komplexität auf als die von *Scn1a* WT Wurfgeschwistern. Die Analyse des von den Nestern präpubertärer Tiere während der viertägigen Untersuchungsperiode erreichten Summenscores zeigte keinen signifikanten Effekt des Genotyps auf die Nestkomplexität (Abb. 12, ART ANOVA: Genotyp $F_{1,16} = 7.88$, $p = 0.01$, FDR-korrigiertes $p = 0.059$).

Die Analyse des Nestbauverhaltens bei sexuell reifen Tieren zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps auf die Nestkomplexität am ersten und zweiten Untersuchungstag (Abb. 12, ART ANOVA: Tag 1 Genotyp $F_{1,16} = 15.15$ $p = 0.001$, FDR-korrigiertes $p = 0.009$, Tag 2 Genotyp $F_{1,16} = 6.37$ $p = 0.02$, Tag 3 Genotyp $F_{1,16} = 8.21$ $p = 0.01$, FDR-korrigiertes $p = 0.056$, Tag 4 Genotyp $F_{1,16} = 0.00$, $p = 0.09$). Am zweiten Untersuchungstag konnte zudem eine signifikante Interaktion des Genotyps und des Geschlechts festgestellt werden (Abb. 12, ART ANOVA: Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,16} = 5.44$, $p = 0.03$): während bei den Nestern männlicher Tiere am zweiten Untersuchungstag kein genotypbedingter Unterschied festgestellt werden konnte, bauten weibliche *Scn1a*^{+/-} Mäuse weniger komplexe Nester als ihre weiblichen *Scn1a* WT Wurfgeschwister (*Tukey's HSD*: $p < 0.05$). Die Analyse des Summenscores der viertägigen Untersuchungsperiode bei sexuell reifen Tieren zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps und Geschlechts auf die Nestkomplexität sowie eine signifikante Interaktion (Abb. 12, ART ANOVA: Genotyp $F_{1,16} = 5.98$, $p = 0.03$, Geschlecht $F_{1,16} = 5.43$, $p = 0.03$, Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,16} = 4.52$, $p = 0.049$): während sich die Nester männlicher Tiere statistisch nicht unterschieden, waren die Nester weiblicher *Scn1a*^{+/-} Tiere weniger komplex als die weiblicher

Scn1a WT Wurfgeschwister (*Tukey's HSD*: $p < 0.05$).

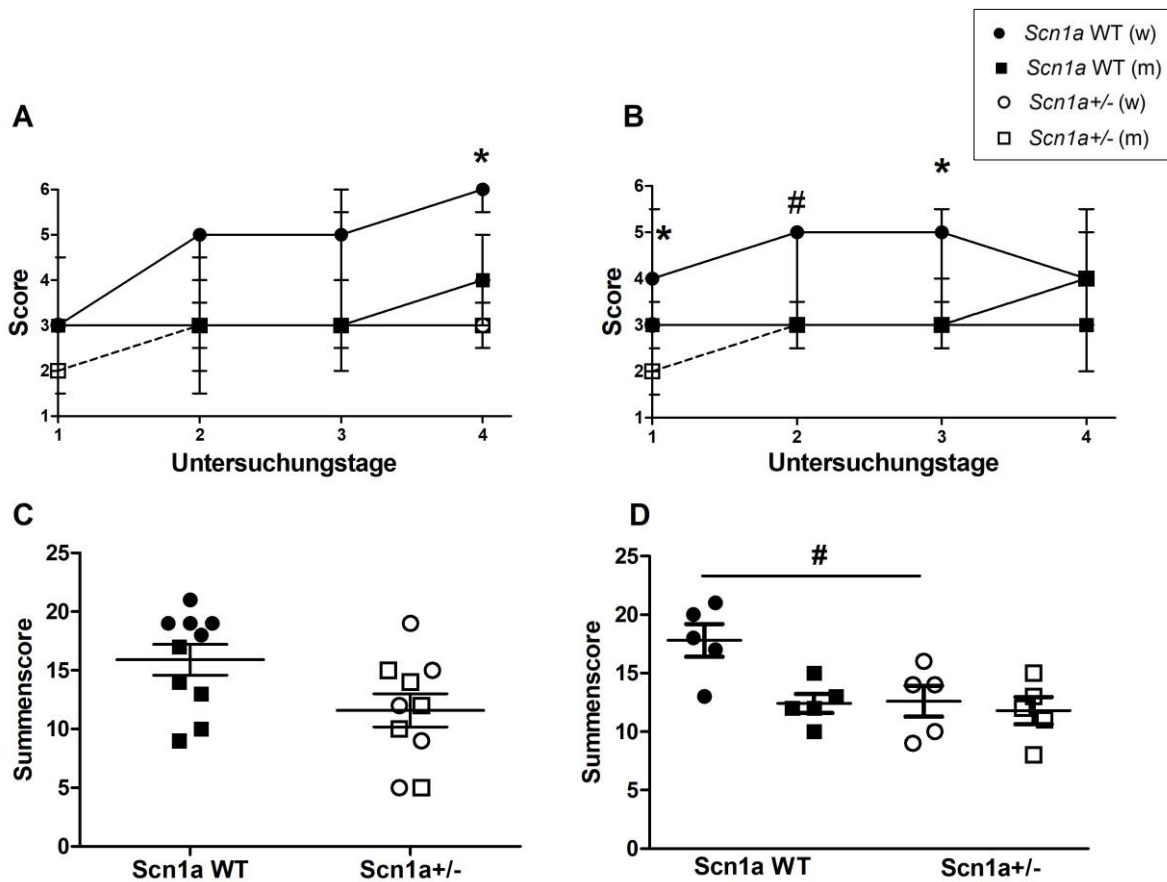


Abbildung 12. Nestbauverhalten. Die Nester präpubertärer Tiere (A) unterschieden sich über die viertägige Untersuchungsperiode hinweg am letzten Untersuchungstag: hier waren die Nester von *Scn1a*^{+/-} Tieren weniger komplex als die von *Scn1a* WT Wurfgeschwistern. Die Nester sexuell reifer Tiere (B) unterschieden sich am ersten Untersuchungstag zwischen den Genotypen, während sich am zweiten Untersuchungstag geschlechtsspezifisch nur die Nester weiblicher *Scn1a*^{+/-} Tiere von denen der *Scn1a* WT Wurfgeschwister unterschieden. Der Summenscore, der über die viertägige Untersuchungsperiode erreicht wurde, unterschied sich zwischen den Genotypen nicht bei präpubertären Tieren (C). Bei sexuell reifen Tieren wurde ein geschlechtsspezifischer Effekt des Genotyps auf die Nestkomplexität festgestellt (D). Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$ (beide Geschlechter), # $p < 0.05$ weibliche Tiere. $n = 5$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur (A, B, C) oder *Tukey's HSD* (B, D); Median (IQR).

Heimkäfigaktivität

Die Analyse der Gesamtaktivität im PhenoTyper-Käfig konnte keinen signifikanten Effekt des Genotyps auf die innerhalb der 60-minütigen Untersuchungsperiode zurückgelegte Distanz zeigen (Abb. 13). Dabei unterschied sich die Fortbewegungsgeschwindigkeit der präpubertären Tiere zwischen den Genotypen (Abb. 13, ANOVA: Genotyp $F_{1,36} = 7.69$, $p = 0.009$, FDR-korrigiertes $p = 0.047$): *Scn1a*^{+/-} Tiere bewegten sich mit höherer Geschwindigkeit fort als *Scn1a* WT Tiere. Die Untersuchungen bei sexuell reifen Tieren ergaben einen signifikanten Effekt des Genotyps auf die zurückgelegte Distanz und die Fortbewegungsgeschwindigkeit (Abb. 13, ANOVA: Distanz, Genotyp $F_{1,36} = 26.44$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$, Geschwindigkeit Genotyp $F_{1,36} = 9.88$, $p = 0.003$, FDR-korrigiertes $p = 0.02$): hierbei legten sexuell reife *Scn1a*^{+/-} Mäuse eine geringere Strecke zurück als *Scn1a* WT Wurfgeschwister. Ein relevanter Effekt des Geschlechts und eine Interaktion der Haupteffekte wurden in den vorgenannten Analysen der Distanz und Geschwindigkeit nicht detektiert.

Die zonenspezifische Analyse der Heimkäfigaktivität innerhalb des 60-minütigen Untersuchungsintervalls zeigte für die Aufenthaltsdauer präpubertärer Tiere in der Futter- und Tränkezone eine signifikante Interaktion der Haupteffekte (Abb. 14, ANOVAs: Futterzone, Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,36} = 11.60$, $p = 0.002$; Tränkezone, Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,36} = 10.02$, $p = 0.003$): männliche *Scn1a* WT Tiere hielten sich kürzer in der Futter- und Tränkezone auf als *Scn1a*^{+/-} Tiere (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.01$, resp. $p < 0.01$). Die Aufenthaltsdauer sexuell reifer Tiere in der Futter- und Tränkezone unterschied sich unabhängig vom Geschlecht der Tiere zwischen den Genotypen (Abb. 14, ANOVAs: Futterzone, Genotyp $F_{1,36} = 46.46$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; Tränkezone Genotyp $F_{1,36} = 52.18$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$): *Scn1a* WT Tiere verbrachten mehr Zeit in der Futter- und Tränkezone als *Scn1a*^{+/-} Tiere.

Die Analyse der Aufenthaltsdauer in der Zentrumszone des PhenoTyper-Käfigs während des 60-minütigen Untersuchungsintervalls zeigte keine Gruppenunterschiede bei präpubertären Tieren. Die Analyse bei sexuell reifen Tieren demonstrierte eine signifikante Interaktion der Haupteffekte (Abb. 14, ANOVA: Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,36} = 13.73$, $p = 0.0007$): Während bei männlichen Tieren keine Gruppenunterschiede detektiert wurden, zeigten weibliche *Scn1a*^{+/-} Tiere im Vergleich zu weiblichen *Scn1a* WT Tieren eine verringerte Aufenthaltsdauer in der Zentrumszone des Käfigs (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.0001$).

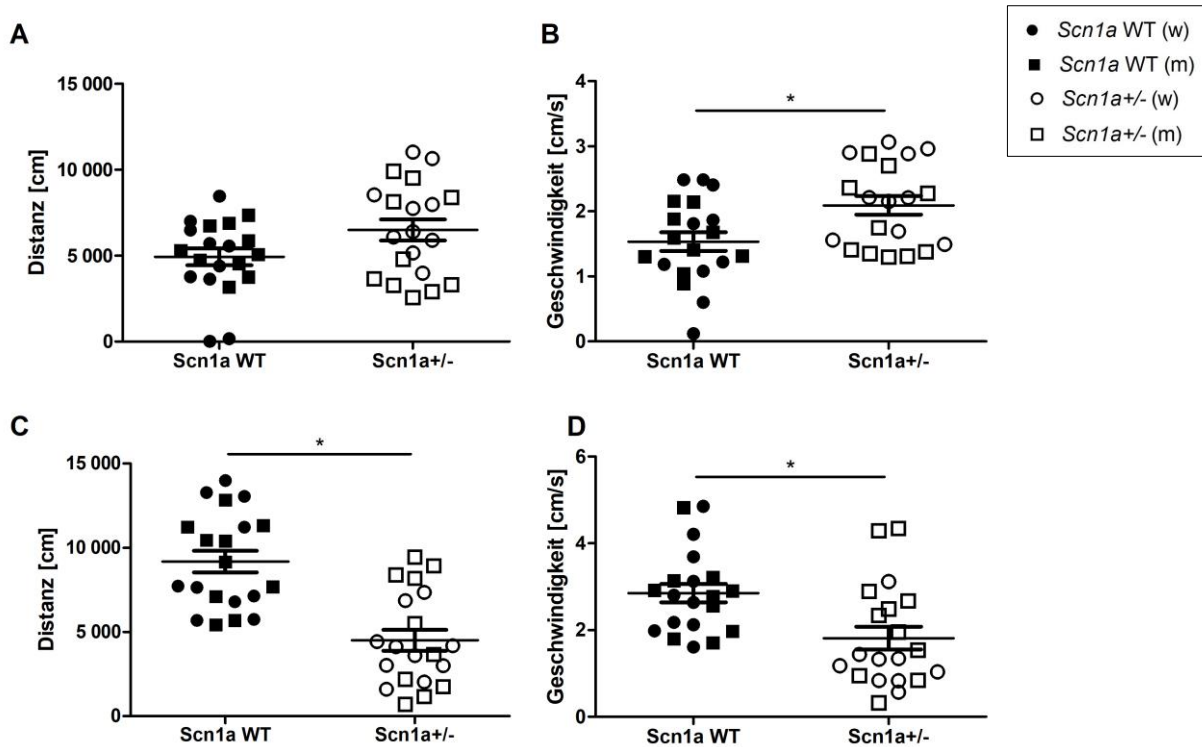


Abbildung 13. Gesamtaktivität im PhenoTyper-Käfig. Innerhalb des 60-minütigen Untersuchungsintervalls legten präpubertäre *Scn1a*+/- Tiere keine größere Distanz als *Scn1a* WT Wurfgeschwister zurück (A), bewegten sich aber mit erhöhter Geschwindigkeit fort (B). Sexuell reife *Scn1a*+/- Tiere legten innerhalb der 60-minütigen Untersuchungsperiode eine geringere Distanz zurück (C) und bewegten sich mit geringerer Geschwindigkeit fort (D). Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

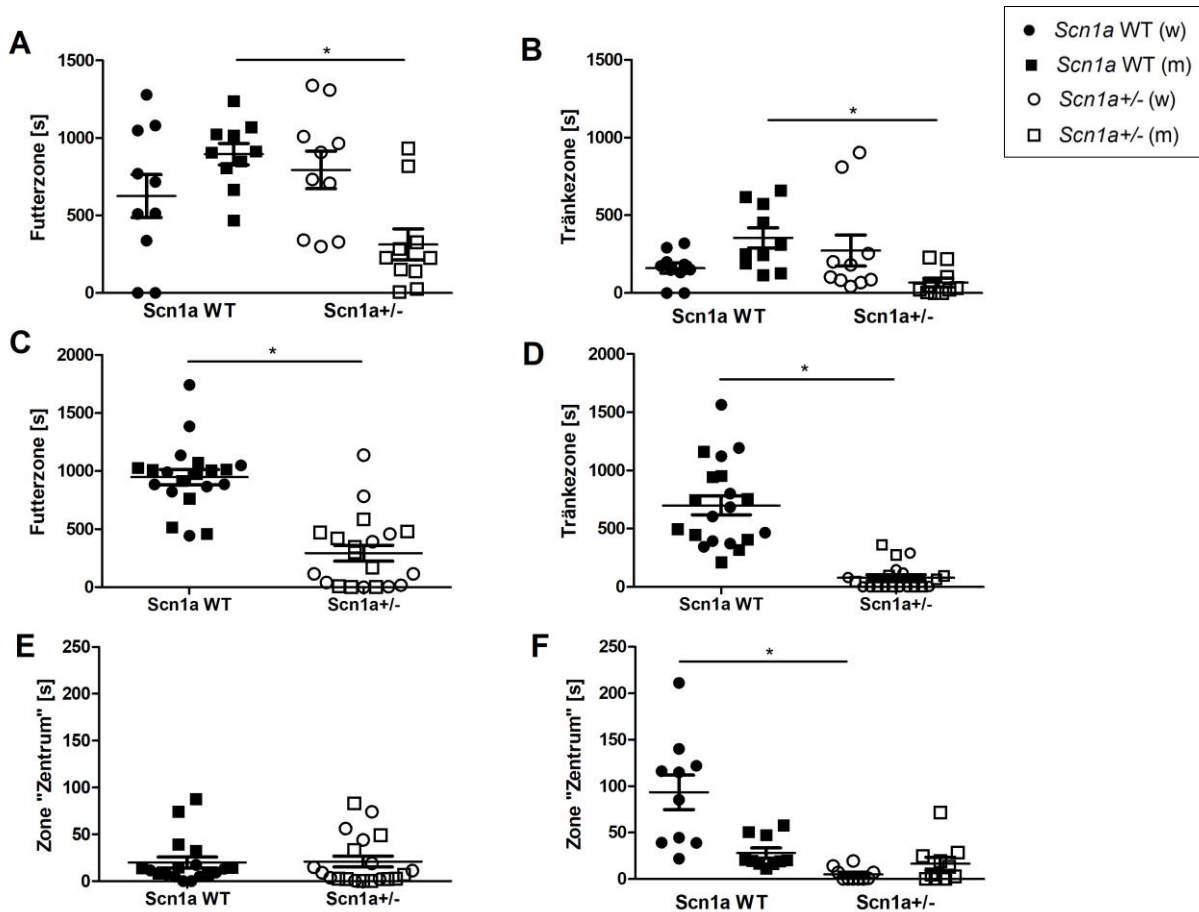


Abbildung 14. Zonenspezifische Aktivität im PhenoTyper-Käfig. Die Analyse der Aufenthaltsdauer in der Futter- und Tränkezone während des 60-minütigen Untersuchungsintervalls zeigte geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen den Genotypen bei präpubertären Tieren (A, B). Ein Effekt des Genotyps auf die Aufenthaltsdauer in der Futter- und Tränkezone konnte bei sexuell reifen Tieren demonstriert werden (C, D). Die Aufenthaltsdauer präpubertärer Tiere in der Zentrumszone des Käfigs unterschied sich nicht zwischen den Genotypen (E), wohingegen bei sexuell reifen Tieren ein geschlechtsspezifischer Unterschied zwischen den Genotypen detektiert wurde (F). Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit Bonferroni-Korrektur (A, B, F) oder FDR-Korrektur (C, D); Mittelwert \pm SEM.

Open-Field-Test

Innerhalb der ersten fünf Minuten nach Einsetzen der Tiere in die Open-Field-Arenen hielten sich präpubertäre *Scn1a*^{+/-} Tiere länger im Wandbereich der Arena auf als *Scn1a* WT Wurfgeschwister (Abb. 15, ANOVA: Genotyp, $F_{1,36} = 13.98$, $p = 0.0006$, FDR-korrigiertes $p = 0.004$). Die Aufenthaltsdauer sexuell reifer Tiere in der äußeren Zone unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (Abb. 15). Die Auswertung der Zeitdauer, die präpubertäre Tiere im Zentrum der Arena verbrachten, zeigte keine Gruppenunterschiede auf (Abb. 15).

Die Analyse der gesamten, 15-minütigen Expositionsdauer konnte einen signifikanten Effekt des Genotyps auf die zurückgelegte Distanz in präpubertären und sexuell reifen Tieren demonstrieren (Abb. 16, Präpubertät, Genotyp $F_{1,36} = 37.89$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; sexuelle Reife, Genotyp $F_{1,36} = 125.3$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$): *Scn1a*^{+/-} Tiere legten in beiden Altersphasen eine größere Distanz zurück als *Scn1a* WT Wurfgeschwister. *Scn1a*^{+/-} Tiere richteten sich im präpubertären Alter und nach Erreichen der sexuellen Reife während der Gesamtexpositionsdauer häufiger auf (*Rearing*) als *Scn1a* WT Tiere (Abb. 16, Präpubertät Genotyp $F_{1,36} = 23.93$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; sexuelle Reife Genotyp $F_{1,36} = 71.97$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$). Zudem ergab die Analyse einen signifikanten Effekt des Genotyps auf die Anzahl der „Sprünge“ gegen die Arenawand bei sexuell reifen Tieren (Abb. 16, Präpubertät Genotyp $F_{1,36} = 23.93$, $p = 0.03$, FDR-korrigiertes $p = 0.1$; sexuelle Reife Genotyp $F_{1,36} = 71.97$, $p = 0.0003$, FDR-korrigiertes $p = 0.002$): Sexuell reife *Scn1a*^{+/-} Tiere sprangen häufiger gegen die Arenawand als *Scn1a* WT Tiere.

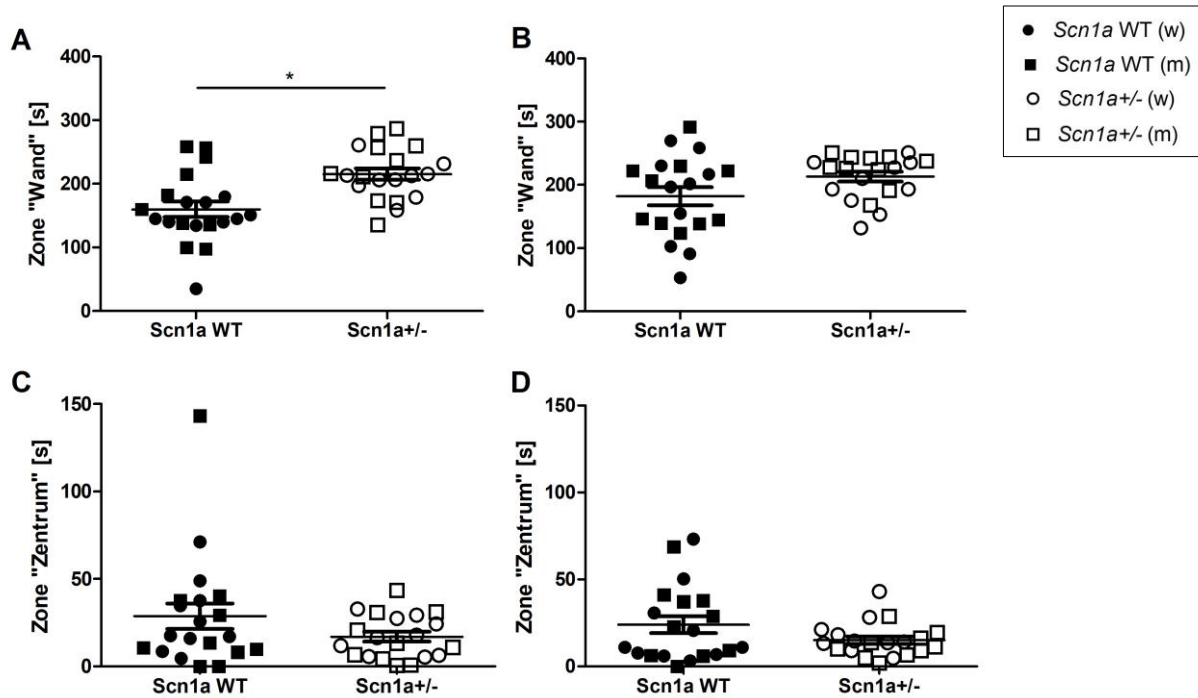


Abbildung 15. Open-Field-Test. Innerhalb der ersten fünf Minuten nach Einsetzen der Tiere in die Arena hielten sich präpubertäre *Scn1a*+/- Tiere länger im Wandbereich auf als *Scn1a* WT Wurfgeschwister (A), während bei den Tieren nach Erreichen der sexuellen Reife keine Gruppenunterschiede detektiert werden konnten (B). Die Aufenthaltsdauer in der Zentrumszone der Arena von präpubertären Tieren (C) und sexuell reifen Tiere (D) unterschied sich nicht zwischen den Genotypen. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

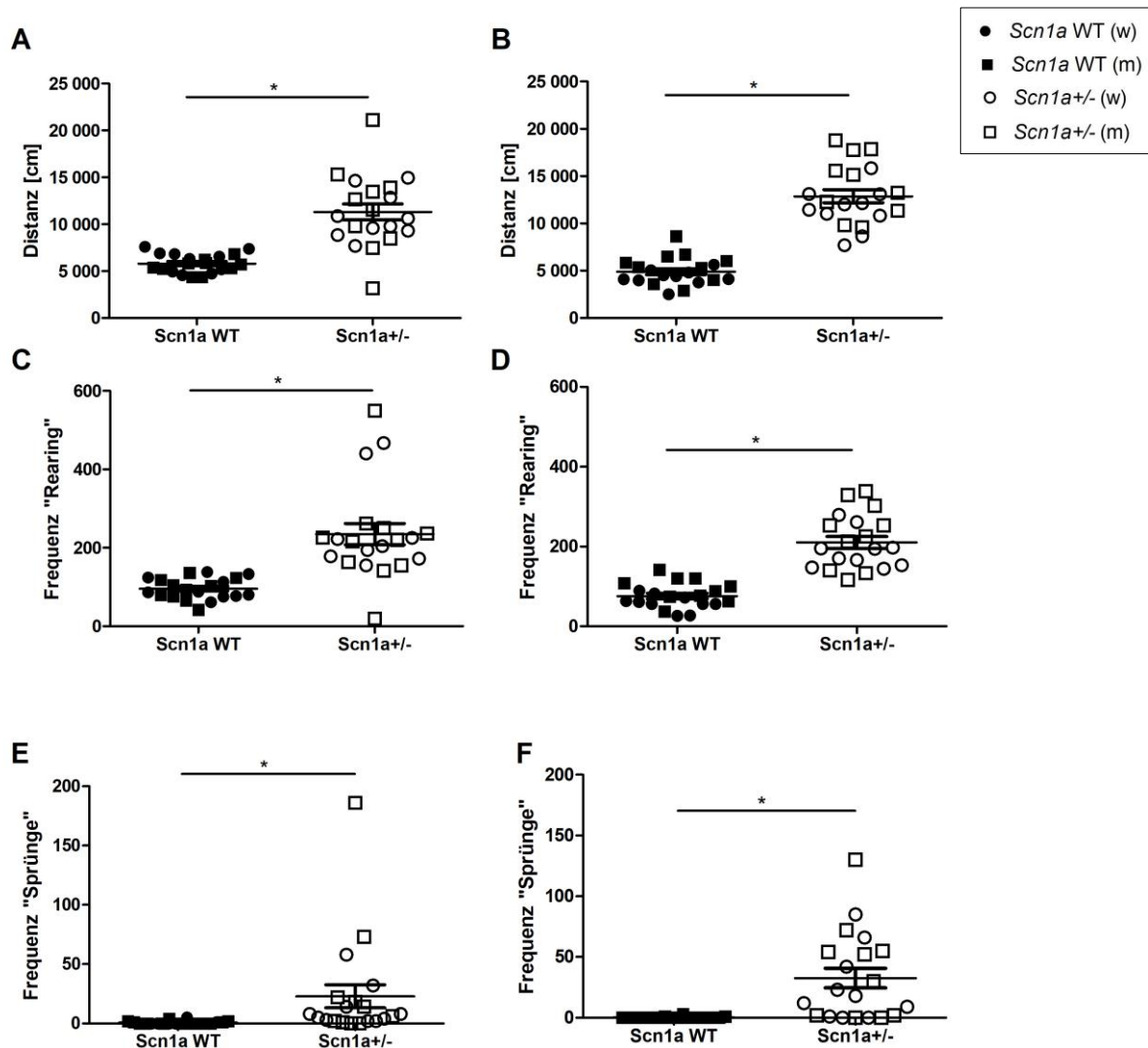


Abbildung 16. Open-Field-Test. Innerhalb der gesamten Testdauer von 15 Minuten zeigte sich ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die von präpubertären (A) und sexuell reifen (B) Tieren zurückgelegte Distanz. Zudem zeigten präpubertäre (C) und sexuell reife (D) *Scn1a*+/- Tiere häufiger die Position *Rearing* als *Scn1a* WT Wurfgeschwister. Ein Einfluss des Genotyps auf die Anzahl der „Sprünge“ gegen die Arenawand konnte nicht bei präpubertären Tieren (E), jedoch bei sexuell reifen Tieren (F) detektiert werden. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

Irwin-Score

Bei der Analyse des Irwin-Tests zeigte sich ein Effekt des Genotyps auf den Summenscore zu allen drei Untersuchungszeitpunkten (Abb. 17 ART ANOVAs: Präpubertät, Genotyp $F_{1,36} = 4.42$, $p = 0.04$, FDR-korrigiertes $p = 0.15$; Pubertät, Genotyp $F_{1,36} = 17.19$, $p = 0.0002$, FDR-korrigiertes $p = 0.002$; Sexuelle Reife, Genotyp $F_{1,36} = 10.15$, $p = 0.003$, FDR-korrigiertes $p = 0.02$). Pubertäre und sexuell reife *Scn1a*+/- Tiere wiesen höhere Summenscores auf als *Scn1a* WT Wurfgeschwister (FDR-Korrektur: $p = 0.002$, resp. $p = 0.02$). Die Erhöhung der

Summenscores konnte auf die Erhöhung der folgenden *Handling*-assoziierten Parameter zurückgeführt werden: Reizbarkeit, Berührungsreaktion, Vokalisation und Harnabsatz.

Die Analyse der Körpertemperatur der Tiere zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps bei präpubertären, pubertären und sexuell reifen Tieren (Abb. 17, ART ANOVAs: Präpubertät, Genotyp $F_{1,34} = 11.22$, $p = 0.002$, FDR-korrigiertes $p = 0.01$; Pubertät, Genotyp $F_{1,36} = 4.33$, $p = 0.04$, FDR-korrigiertes $p = 0.15$; Sexuelle Reife, Genotyp $F_{1,36} = 23.83$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$): hierbei wiesen *Scn1a*^{+/-} Tiere niedrigere Körpertemperaturen auf als *Scn1a* WT Wurfgeschwister.

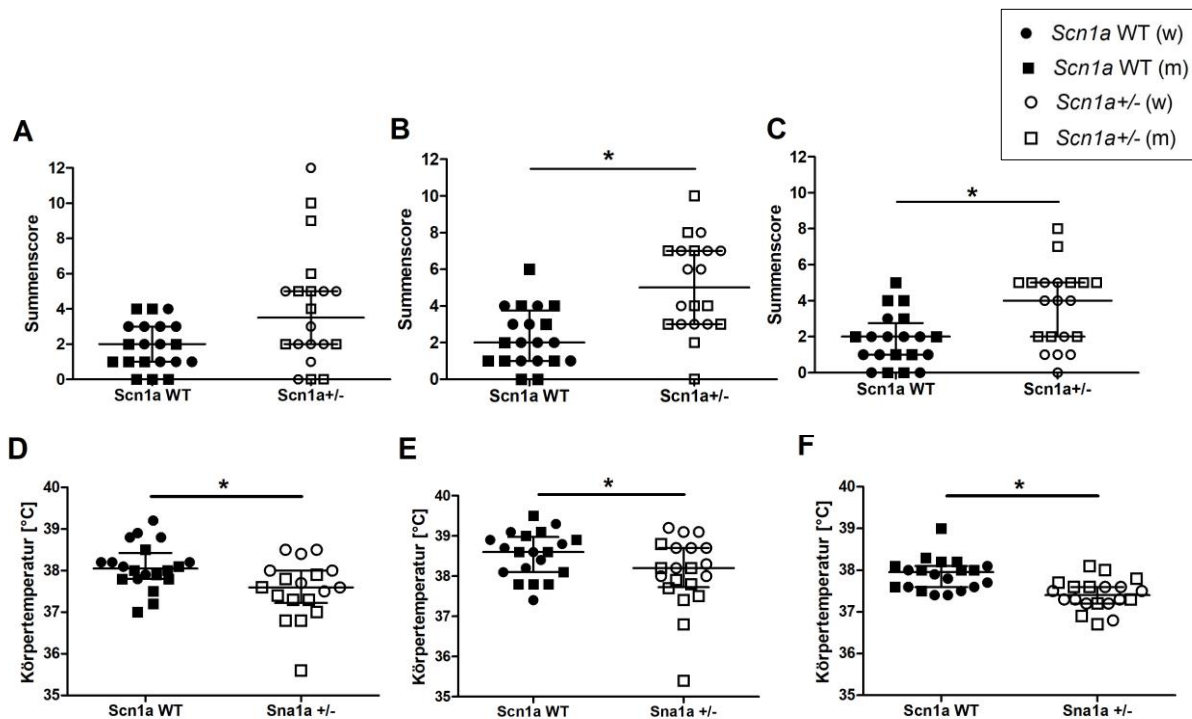


Abbildung 17. Irwin-Score und Körpertemperatur. Die Auswertung des Summenscores bei präpubertären (A), pubertären (B) und sexuell reifen (C) Tieren ergab einen signifikanten Effekt des Genotyps auf den Summenscore zum Zeitpunkt der Pubertät sowie nach Erreichen der sexuellen Reife. Der Summenscore ergibt sich aus der Addition aller Einzelscores. Die Analyse der Körpertemperatur bei präpubertären (D), pubertären (E) und sexuell reifen (F) Tieren zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps bei präpubertären und sexuell reifen Tieren. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ART ANOVA mit FDR-Korrektur; Median (IQR).

Fäkale Kortikosteronmetaboliten (FCM)

Die Analyse der fäkalen Kortikosteronmetaboliten konnte weder bei präpubertären noch bei sexuell reifen Tieren einen signifikanten Einfluss des Genotyps auf die Metabolitkonzentration demonstrieren. Ein signifikanter Effekt des Geschlechts hingegen wurde bei sexuell reifen Tieren detektiert (Abb. 18, ANOVA: Geschlecht $F_{1,35}=22.93$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p = 0.001$): unabhängig vom Genotyp wurden in den Proben weiblicher sexuell reifer Tiere höhere Metabolitkonzentrationen gefunden als in denen männlicher Wurfgeschwister. Eine Interaktion der Haupteffekte konnte weder bei präpubertären noch bei sexuell reifen Tieren festgestellt werden.

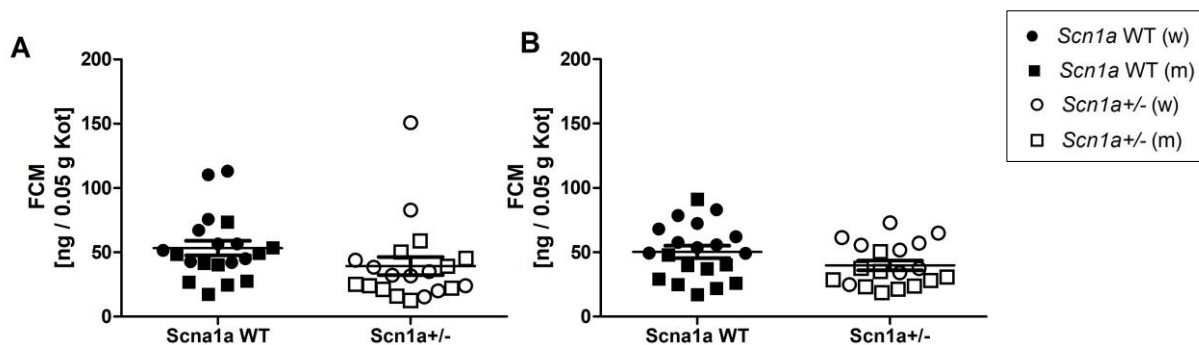


Abbildung 18. Fäkale Kortikosteronmetaboliten (FCM). Die Analyse der Proben präpubertärer (A) und sexuell reifer (B) Tiere konnte keinen signifikanten Effekt des Genotyps auf die Kortikosteronmetabolitkonzentrationen aufzeigen. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA; Mittelwert \pm SEM.

Körpergewicht

Die Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere wurde vom Tag des Absetzens an engmaschig erfasst (Abb. 19). Die Auswertung an einzelnen postnatalen Tagen konnte an P19 und P21 einen signifikanten Effekt des Genotyps auf das Körpergewicht demonstrieren (ANOVAs: P19, Genotyp $F_{1,36} = 77.23$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P21, Genotyp $F_{1,36} = 31.40$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$): unabhängig vom Geschlecht der Tiere wiesen *Scn1a*+/- Tiere ein geringeres Körpergewicht auf als *Scn1a* WT Tiere. An allen darauffolgenden Untersuchungstagen konnte eine signifikante Interaktion des Genotyps mit dem Geschlecht detektiert werden: die Analyse des Datensatzes, der die weiblichen Tiere umfasst, zeigte, dass weibliche *Scn1a*+/- Tiere geringere Körpergewichte an P23, P25 und P27 hatten (Bonferroni-Korrektur: P23 $p < 0.05$, P25 $p < 0.0001$, P27 $p < 0.01$). Die entsprechende Analyse der Daten männlicher Tiere demonstrierte erniedrigte Körpergewichte bei männlichen

Scn1a^{+/-} Tieren im Vergleich zu männlichen *Scn1a* WT Wurfgeschwistern an allen Untersuchungstagen (Bonferroni-Korrektur: P23 $p < 0.0001$, P25 $p < 0.0001$, P27 $p < 0.0001$, P30 $p < 0.0001$, P36 $p < 0.0001$, P42 $p < 0.01$, P49 $p < 0.01$, P55 $p < 0.05$).

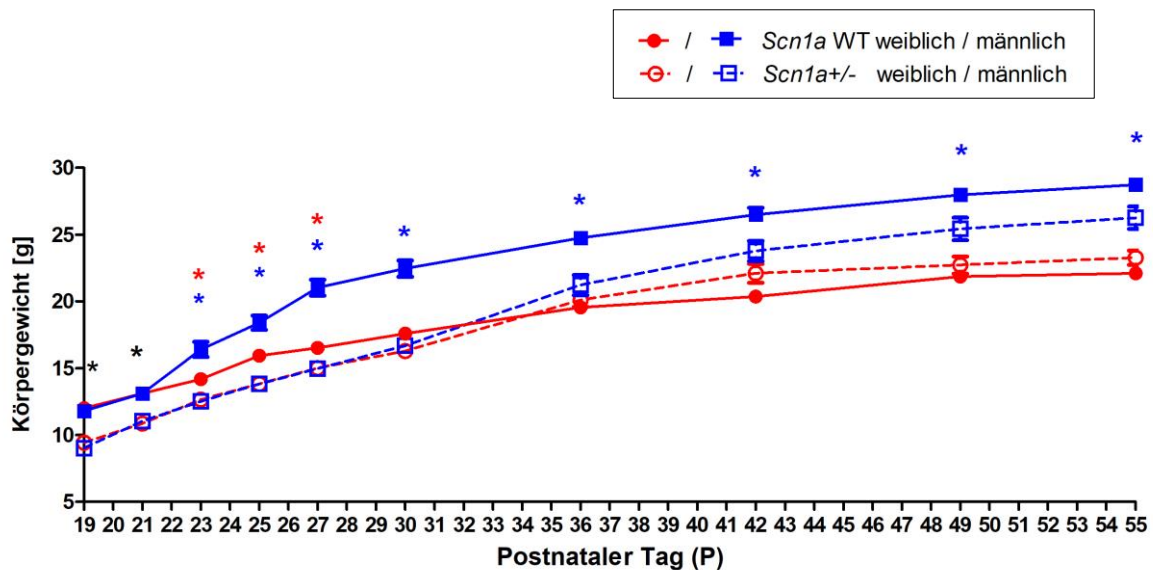


Abbildung 19. Körpergewicht. Die Auswertung der einzelnen Tage, an denen das Gewicht erfasst wurde, zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps auf das Körpergewicht der Tiere an P19 und P21 (* $p < 0.05$). Die geschlechtsspezifische Analyse an allen Untersuchungstagen ab P23 demonstrierte, dass weibliche *Scn1a*^{+/-} Tiere erniedrigte Gewichte im Vergleich zu weiblichen *Scn1a* WT Wurfgeschwistern an P23, P25 und P27 hatten (* $p < 0.05$). Die Gewichte männlicher *Scn1a*^{+/-} Tiere unterschieden sich von denen männlicher *Scn1a* WT Tiere an allen Untersuchungstagen ab P23 (* $p < 0.05$). * $n = 10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur oder Bonferroni-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

Wärmebildbasierte Wurfüberwachung

Die kontinuierliche wärmebildbasierte Wurfüberwachung wurde von P16 bis P19 durchgeführt. Einige Standbilder der Videodateien zeigt die Abb. 20. Hierbei wurde deutlich, dass sich einzelne Jungtiere mit hoher Anfallsaktivität, besonders nach dem Auftreten von Anfällen, von der Gruppe räumlich absonderten. Mit zunehmendem Alter (und Anfallsaktivität) wurde die Separation einzelner Jungtiere deutlicher. Es konnte beobachtet werden, dass das Muttertier zu Beginn der Anfallsaktivität Interesse für die sich separierenden Jungtiere zeigte. Mit zunehmendem Alter der Jungtiere und zunehmender Anfallsschwere zeigte das Muttertier jedoch weniger Interesse an den schwer belasteten, separierten Jungtieren. Das Muttertier wurde dann vermehrt in der Futter- und Tränkezone gemeinsam mit dem restlichen, weniger schwer belasteten Wurf beobachtet. Vor allem direkt nachdem sich Jungtiere von vorausgegangener Anfallsaktivität erholt hatten, fraßen sie von der *DietGel76A*-Zubereitung.

Jungtiere mit einer hohen Anfallslast wurden selten in der Futterzone zusammen mit den Wurfgeschwister beim Fressen beobachtet.

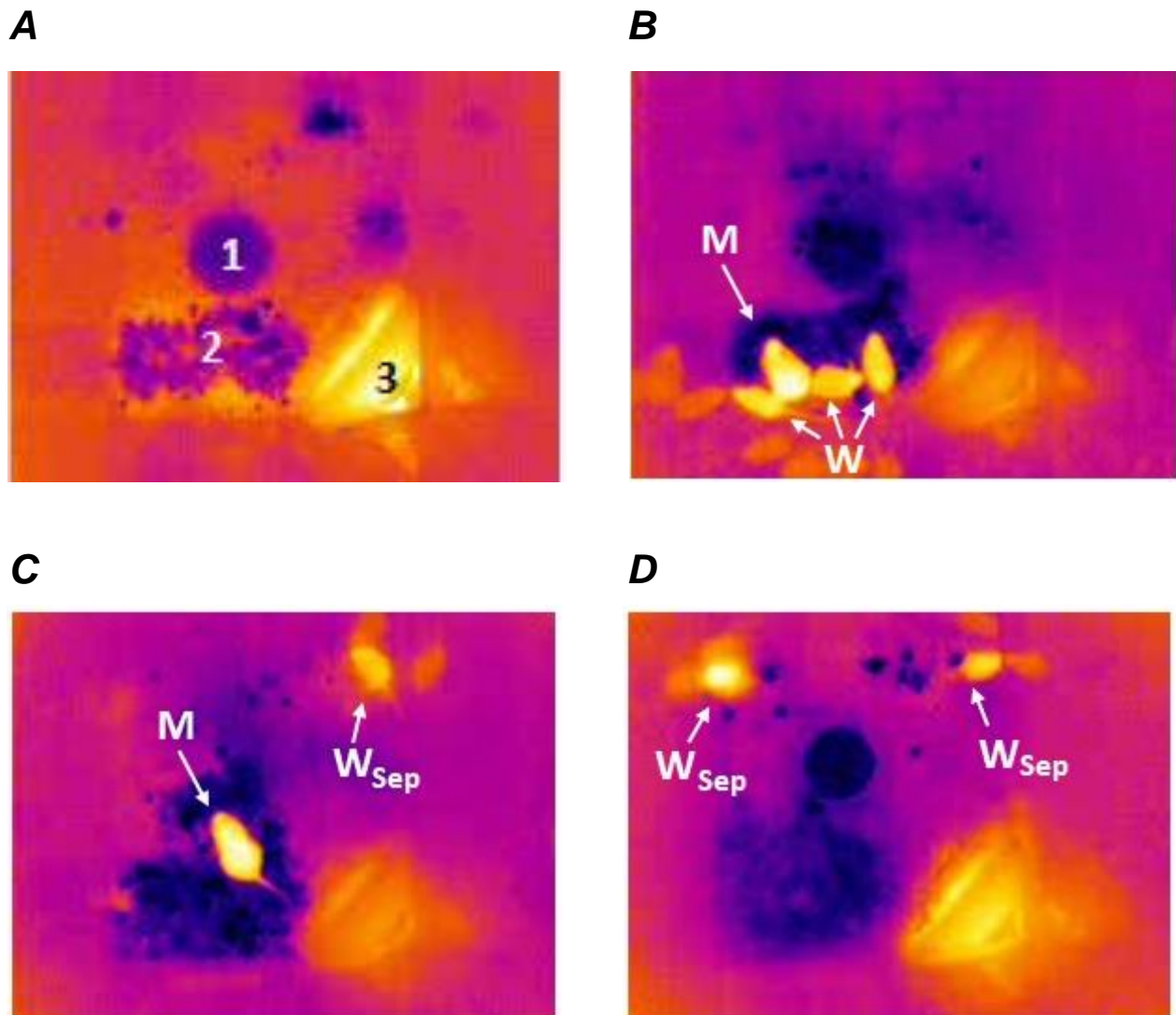


Abbildung 20. Wärmebildbasierte Wurfüberwachung im Heimkäfig.

Die Abbildungen A, B und C zeigen Standbilder der Wurfüberwachung eines Wurfs mit Muttertier an P16 im PhenoTyper-Käfig. Abb. D zeigt ein Standbild von Muttertier (M) und Wurf (W) 72 Stunden später an P19. Abb. A zeigt eine Aufsicht auf den Käfig, als sich das Muttertier mit seinem Wurf im Haus befand (1 = Diätnahrung, 2 = befeuchtete Futterpellets, 3 = dreieckiges Maushaus). In Abb. B befinden sich das Muttertier (M) und drei Geschwister des Wurfs (W) in der Futterzone des Käfigs, während sich die übrigen Wurfgeschwister im Maushaus befinden. Abb. C zeigt das Muttertier in der Futterzone, während ein Jungtier (W_{Sep}) separiert in der rechten oberen Käfigecke liegt. In Abb. D sind zwei separiert liegende Jungtiere abgebildet, während sich das Muttertier und der Rest des Wurfs im Maushaus befinden.

3. *Gria1*-Modell

Saccharinpräferenz

Die Analyse der Saccharinpräferenz konnte keine Gruppenunterschiede bei präpubertären und sexuell reifen Tieren zeigen (Abb. 21).

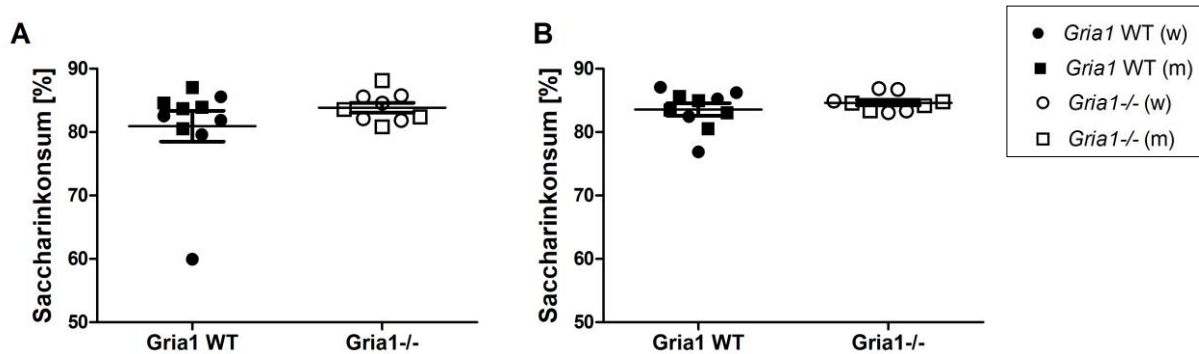


Abbildung 21. Saccharinpräferenz. Die Analyse der Saccharinpräferenz zeigte keine Gruppenunterschiede bei präpubertären (A) und sexuell reifen Tieren (B). Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 4-5$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA; Mittelwert \pm SEM.

Wühlverhalten

Die Analyse des Wühlverhaltens während der Dunkelphase bei sexuell reifen Tieren zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps auf die von den Tieren gewählte Substratmenge am ersten sowie am zweiten Testtag (Abb. 22, ANOVAs: Tag 1 Genotyp $F_{1,15} = 20.07$, $p = 0.0004$, FDR-korrigiertes $p = 0.003$; Tag 2 Genotyp $F_{1,15} = 10.24$, $p = 0.006$, FDR-korrigiertes $p = 0.03$): *Gria1*^{-/-} Tiere wühlten in beiden Dunkelphasen eine geringere Substratmenge als *Gria1* WT Wurfgeschwister. Dabei wurde ein Einfluss des Geschlechts und eine Interaktion der Haupteffekte nicht festgestellt. Die Analyse des Wühlverhaltens in der Hellphase zeigte an beiden Testtagen keine Gruppenunterschiede auf (Abb. 22).

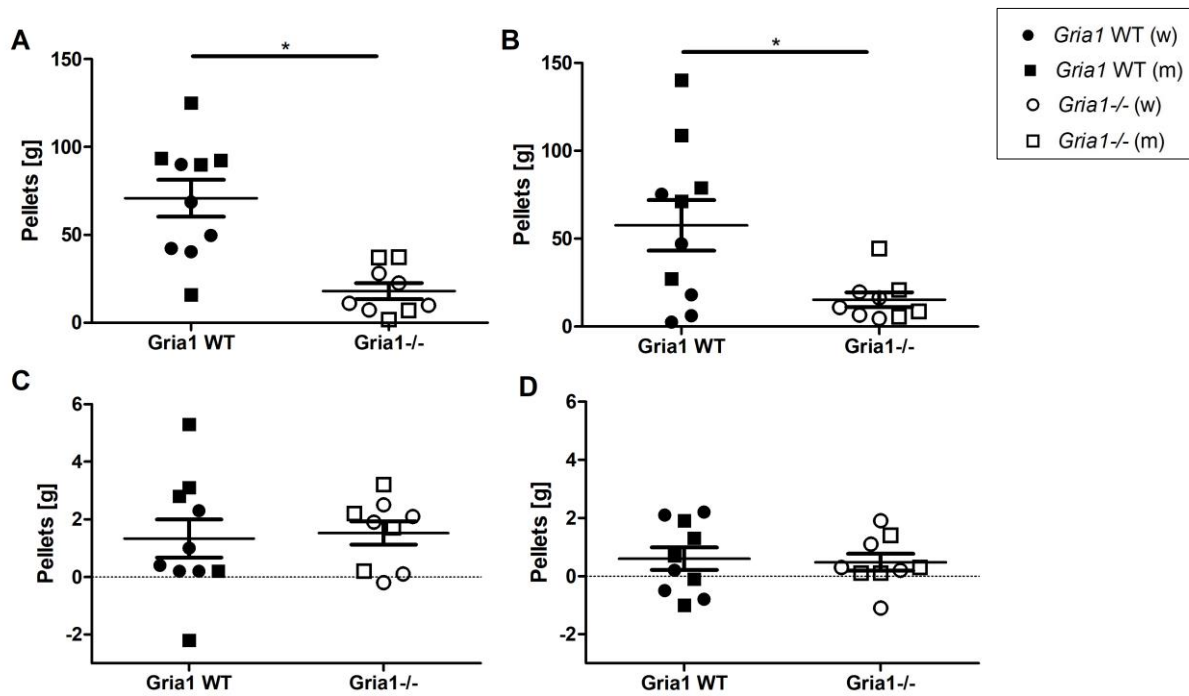


Abbildung 22. Wühlverhalten. Während die Analyse des Wühlverhaltens in der ersten (A) und zweiten (B) Dunkelphase eine genotypassoziierte Reduktion des gewählten Substrats (Pellets) zeigte, konnte die Analyse des Wühlverhaltens im ersten (C) und zweiten (D) 120-minütigen Hellphasentest keine Gruppenunterschiede bestätigen. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 4-5$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

Nestbauverhalten

Das Nestbauverhalten präpubertärer Tiere unterschied sich am ersten Untersuchungstag geschlechtsspezifisch zwischen weiblichen *Gria1*^{-/-} und weiblichen *Gria1* WT Tieren (Abb. 23, ART ANOVA: Genotyp x Geschlecht Interaktion $F_{1,15} = 5.86$, $p = 0.03$): die Nester weiblicher *Gria1*^{-/-} Tiere wurden am ersten Untersuchungstag mit niedrigeren Scores bewertet als die weiblicher *Gria1* WT Wurfgeschwister (*Tukey's HSD*: $p < 0.01$). Am zweiten Untersuchungstag konnten keine Gruppenunterschiede bestätigt werden. Am dritten und vierten Untersuchungstag konnte ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die Nestkomplexität detektiert werden (Abb. 23, ART ANOVAs: Tag 3, Genotyp $F_{1,15} = 10.07$, $p = 0.006$, FDR-korrigiertes $p = 0.03$; Tag 4, Genotyp $F_{1,15} = 8.29$, $p = 0.01$, FDR-korrigiertes $p = 0.0049$): Nester von *Gria1*^{-/-} Tieren wurden mit geringeren Komplexitätsscores bewertet als Nester von *Gria1* WT Tieren. Die Analyse des Nestbauverhaltens sexuell reifer Tiere zeigte einen Effekt des Genotyps an allen vier Untersuchungstagen (Abb. 23, ART ANOVAs: Tag 1 Genotyp $F_{1,15} = 18.62$, $p = 0.0006$, FDR-korrigiertes $p = 0.004$; Tag 2 Genotyp $F_{1,15} = 99.54$, $p < 0.0001$; Tag 3 Genotyp $F_{1,15} = 61.20$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; Tag 4 Genotyp

$F_{1,15} = 51.96, p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$). Am zweiten Untersuchungstag konnte ein geschlechtsspezifischer Gruppenunterschied detektiert werden (Abb. 23, ART ANOVA: Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,15} = 7.15, p = 0.02$): während bei den Nestern männlicher Tiere keine Gruppenunterschiede festgestellt werden konnten, erreichten die Nester weiblicher *Gria1*^{-/-} Tiere einen geringen Komplexitätsscore am zweiten Untersuchungstag als die weiblichen *Gria1* WT Wurfgeschwister (*Tukey's HSD*: $p = 0.0001$).

Die Auswertung der Summenscores, die über die viertägige Untersuchungsperiode erreicht wurden, ergab einen signifikanten Effekt des Genotyps auf die Komplexität der Nester präpubertärer und sexuell reifer Tiere (Abb. 23, ART ANOVA: Präpubertät, Genotyp $F_{1,15} = 10.19, p = 0.006$, FDR-korrigiertes $p = 0.03$; sexuelle Reife, Genotyp $F_{1,15} = 46.58, p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$). Ein signifikanter Effekt des Geschlechts auf den Summenscore wurde in keiner Altersphase gefunden und eine relevante Interaktion der Haupteffekte wurde nicht detektiert.

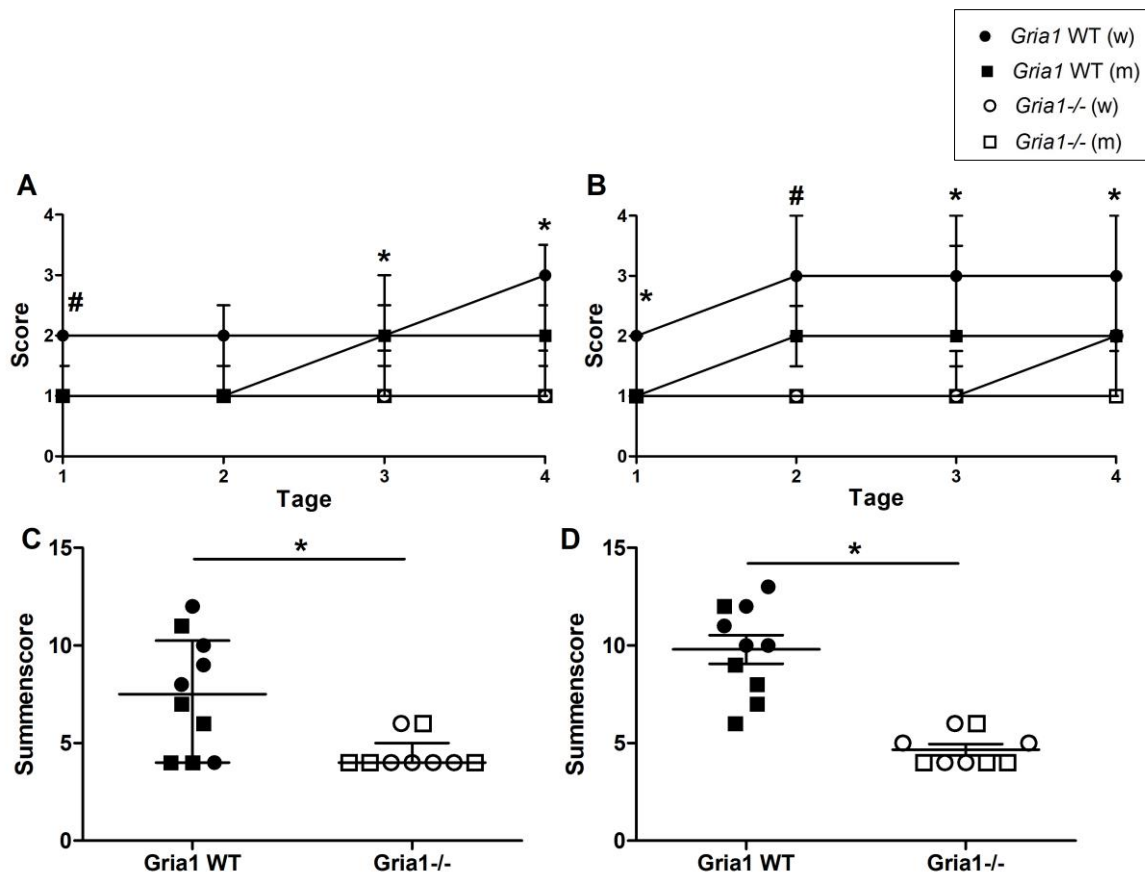


Abbildung 23. Nestbauverhalten. Die Analyse des Nestbauverhaltens während der viertägigen Untersuchungsperiode zeigte bei präpubertären (A) und sexuell reifen (B) Tieren Unterschiede zwischen den Genotypen an einzelnen Untersuchungstagen. Die Nester präpubertärer Tiere unterschieden sich am ersten Untersuchungstag zwischen den Genotypen nur bei weiblichen Tieren, während sich bei sexuell reifen Tieren ein geschlechtsspezifischer

Unterschied am zweiten Untersuchungstag zeigte. Die von den Nestern präpubertärer (C) und sexuell reifer (D) Tieren erreichten Summenscores demonstrierten einen signifikanten Effekt des Genotyps auf die Nestkomplexität. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$ (beide Geschlechter); # $p < 0.05$ (weibliche Tiere). $n = 4-5$ pro Genotyp pro Geschlecht. ART ANOVA mit FDR-Korrektur (A, B, C, D) oder *Tukey's HSD* (A, B); Median (IQR).

Laufradaktivität

Die Analyse der Distanz, die die Tiere innerhalb des Untersuchungszeitraums von jeweils vier Tagen im Laufrad zurücklegten, zeigte keine Unterschiede zwischen den Genotypen bei präpubertären und sexuell reifen Tieren (Abb. 24). Ein Effekt des Geschlechts auf die Distanz konnte bei sexuell reifen Tieren festgestellt werden (Abb. 24, ANOVA: Geschlecht $F_{1,15} = 13.31$, $p = 0.002$): unabhängig vom Genotyp legten weibliche Tiere größere Strecken zurück als männliche Tiere (FDR-korrigiertes $p = 0.01$). Eine signifikante Interaktion der Haupteffekte wurde zu keinem Untersuchungszeitpunkt festgestellt.

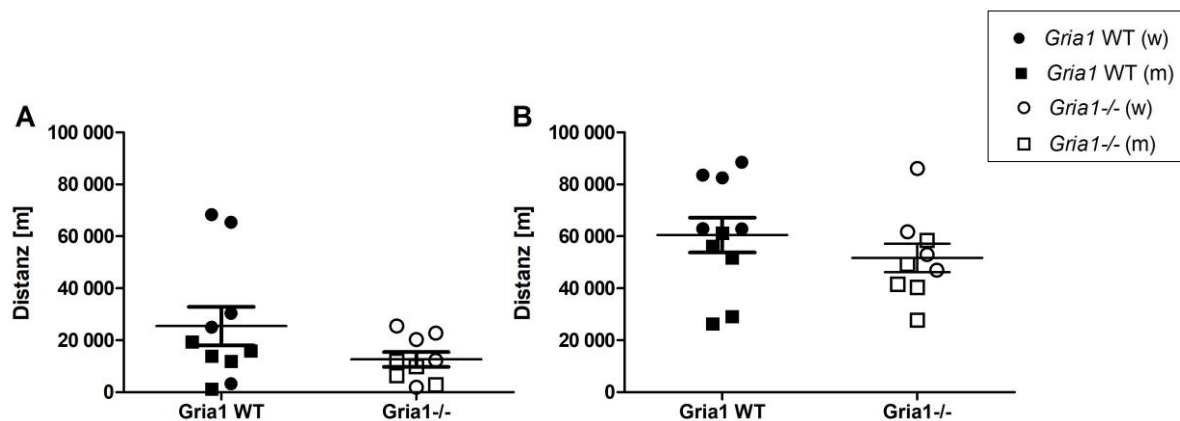


Abbildung 24. Laufradaktivität. Die von den Tieren in der viertägigen Untersuchungsphase zurückgelegte Distanz im Laufrad unterschied sich bei präpubertären (A) und sexuell reifen (B) Tieren nicht zwischen den Genotypen. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 4-5$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA; Mittelwert \pm SEM.

Heimkäfigaktivität

Die Analyse der Gesamtaktivität im PhenoTyper-Käfig während des 60-minütigen Untersuchungsfensters konnte keine Gruppenunterschiede bei präpubertären Tieren demonstrieren (Abb. 25). Sexuell reife *Gria1*^{-/-} Tiere legten eine größere Distanz im Heimkäfig zurück als *Gria1* WT Tiere (Abb. 25, ANOVA: $F_{1,34} = 33.87$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$), während sich ihre Fortbewegungsgeschwindigkeit nicht unterschied (Abb. 25).

Die Auswertung der zonenspezifischen Heimkäfigaktivität zeigte hinsichtlich der Aufenthaltsdauer präpubertärer Tiere in der Tränkezone eine signifikante Interaktion der Haupteffekte (Abb. 26, ANOVA: Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,34} = 4.2$, $p = 0.048$): männliche präpubertäre *Gria1*^{-/-} Tiere hielten sich länger in der Tränkezone auf als männliche *Gria1* WT Wurfgeschwister (Bonferroni post-hoc Test: $p < 0.05$). Die Aufenthaltsdauer sexuell reifer Tiere in der Tränkezone unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (Abb. 26). Präpubertäre und sexuell reife *Gria1*^{-/-} Tiere hielten sich länger in der Futterzone auf als *Gria1* WT Wurfgeschwister (Abb. 26, ANOVA: Präpubertät, Genotyp $F_{1,34} = 8.75$, $p = 0.006$, FDR-korrigiertes $p = 0.03$; sexuelle Reife, Genotyp $F_{1,34} = 45.59$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$). Die Auswertung der Aufenthaltsdauer präpubertärer und sexuell reifer Tiere in der Zentrumszone ergab keine Gruppenunterschiede (Abb. 26).

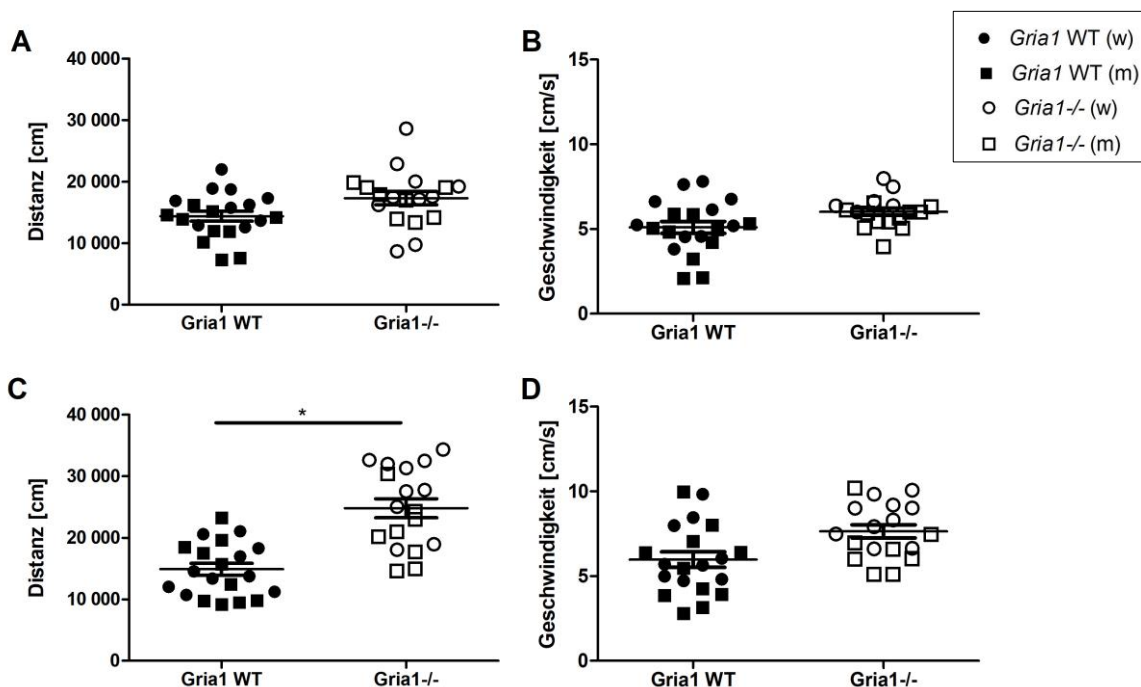


Abbildung 25. Gesamtaktivität im Heimkäfig. Die Auswertung der Gesamtaktivität während der 60-minütigen Untersuchungsphase im PhenoTyper-Käfig zeigte keine Unterschiede hinsichtlich der im Käfig zurückgelegten Distanz (A) und der Fortbewegungsgeschwindigkeit (B) bei präpubertären Tieren. Die von sexuell reifen Tieren im Heimkäfig zurückgelegte Distanz (C) wurde signifikant vom Genotyp der Tiere beeinflusst, während ihre Fortbewegungsgeschwindigkeit (D) nicht unterschied. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 8-10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

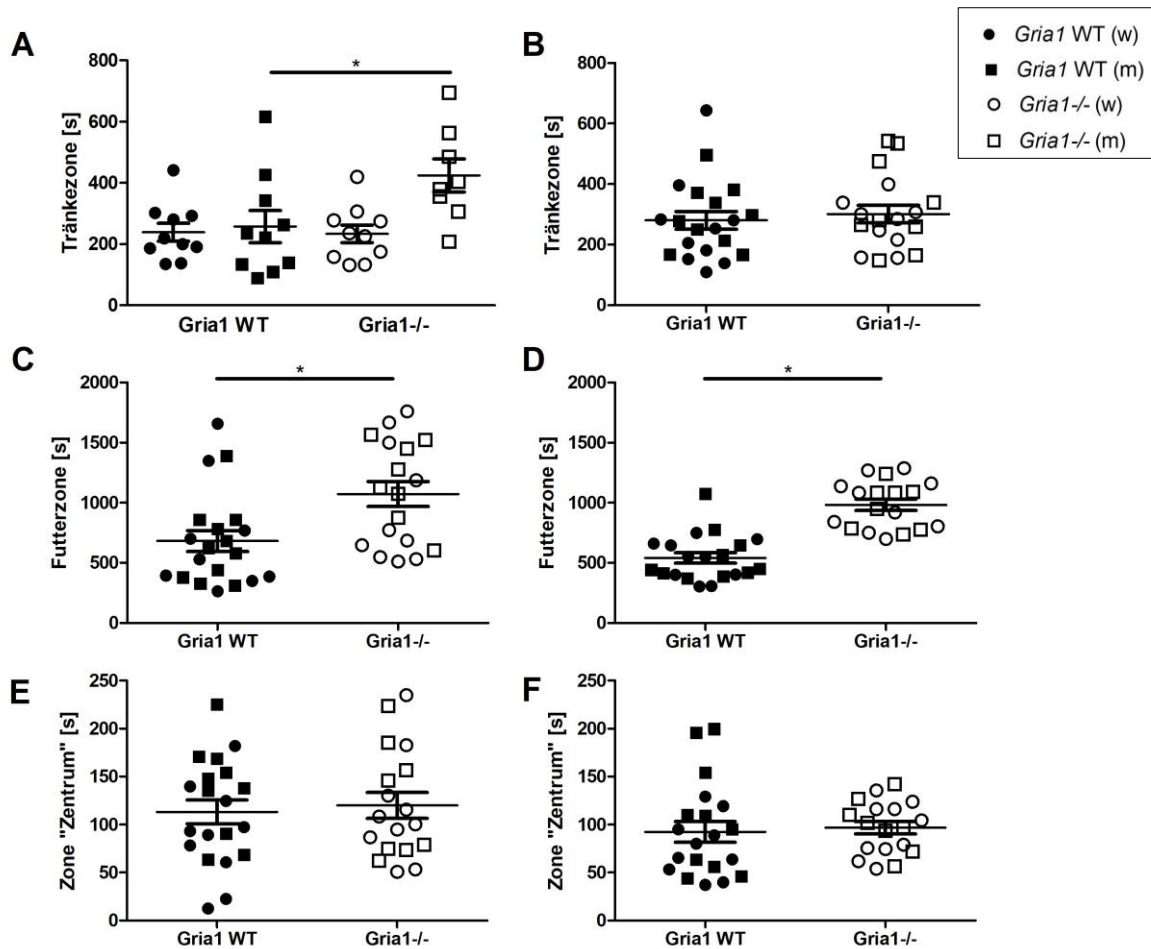


Abbildung 26. Zonenspezifische Heimkäfigaktivität. Die Analyse der Aufenthaltsdauer der Tiere in den Käfigzonen zeigte, dass sich präpubertäre männliche *Gria1*^{-/-} Tiere länger in der Tränkezone aufhielten (A), während sich die Aufenthaltsdauer in dieser Zone bei sexuell reifen Tieren nicht unterschied (B). Die Auswertung der Aufenthaltsdauer präpubertärer (C) und sexuell reifer Tiere (D) in der Futterzone zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps. Die Aufenthaltsdauer präpubertärer (E) und sexuell reifer (F) Tiere in der Zentrumszone unterschied sich nicht zwischen den Genotypen. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 8-10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit Bonferroni-Korrektur (A) oder FDR-Korrektur (C, D); Mittelwert \pm SEM.

Open-Field-Test

Die Analyse der ersten fünf Minuten nach Einsetzen der Tiere in die Open-Field-Arenen ergab hinsichtlich der Aufenthaltsdauer präpubertärer Tiere im Wandbereich der Arena eine signifikante Interaktion der Haupteffekte (Abb. 27, ANOVA: Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,34} = 6.25$, $p = 0.02$): während die Analyse der Daten männlicher Tiere keine Gruppenunterschiede zeigte, verbrachten weibliche *Gria1*^{-/-} Tiere mehr Zeit in der Wandzone als weibliche *Gria1* WT Tiere (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.001$). Die Analyse der Aufenthaltsdauer im Wandbereich bei sexuell reifen Tieren konnte keine Gruppenunterschiede

demonstrieren (Abb. 27). Bei präpubertären Tieren konnte ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die Aufenthaltsdauer in der Zentrumszone festgestellt werden (Abb. 27, ANOVA: Genotyp $F_{1,34} = 12.29$, $p = 0.001$, FDR-korrigiertes $p = 0.007$). Die Auswertung der Aufenthaltsdauer sexuell reifer Tiere in der Zentrumszone zeigte keine Gruppenunterschiede (Abb. 27).

Die Analyse der gesamten Testdauer von 15 Minuten konnte einen signifikanten Effekt des Genotyps auf die zurückgelegte Distanz präpubertärer und sexuell reifer Tiere demonstrieren (Abb. 28, ANOVAs: Präpubertät, Genotyp $F_{1,34} = 195.60$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; sexuelle Reife, Genotyp $F_{1,33} = 232.50$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$): *Grial*^{-/-} Tiere legten zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine größere Strecke zurück als *Grial* WT Tiere. Hinsichtlich der von den Tieren während der gesamten Testdauer gezeigten *Rearing*-Positionen zeigten sich keine Gruppenunterschiede bei präpubertären Tieren (Abb. 27). Bei sexuell reifen Tieren konnte ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die Anzahl der *Rearing*-Positionen festgestellt werden (Abb. 28, Genotyp $F_{1,34} = 9.04$, $p = 0.005$): *Grial*^{-/-} Tiere richteten sich häufiger auf als *Grial* WT Tiere (FDR-korrigiertes $p = 0.03$). Bei präpubertären Tieren unterschied sich die Anzahl der Sprünge gegen die Arenawand in Abhängigkeit vom Genotyp (Abb. 28, Genotyp $F_{1,34} = 10.18$, $p = 0.003$): *Grial* WT Tiere sprangen häufiger gegen die Arenawand als *Grial*^{-/-} Wurfgeschwister (FDR-korrigiertes $p = 0.02$).

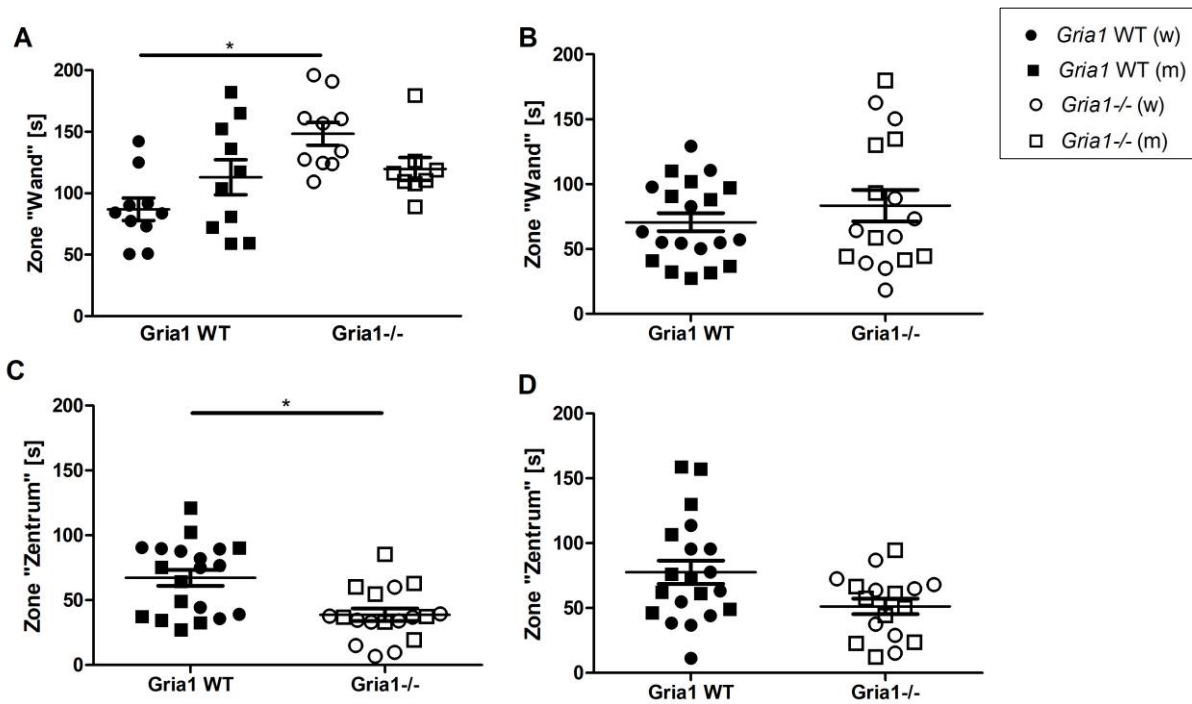


Abbildung 27. Open-Field-Test. Die Auswertung der ersten fünf Minuten zeigte hinsichtlich der Aufenthaltsdauer der Tiere im Wandbereich der Arena einen geschlechtsspezifischen Unterschied zwischen den Genotypen bei präpubertären Tieren (A) und konnte keinen Unterschied bei sexuell reifen Tieren aufzeigen (B). Die Aufenthaltsdauer präpubertärer Tiere im Zentrum der Arena während der ersten fünf Minuten unterschied sich zwischen den Genotypen (C), während bei sexuell reifen Tieren keine Gruppenunterschiede detektiert werden konnten (D). Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 8-10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit Bonferroni-Korrektur (A) oder FDR-Korrektur (C); Mittelwert \pm SEM.

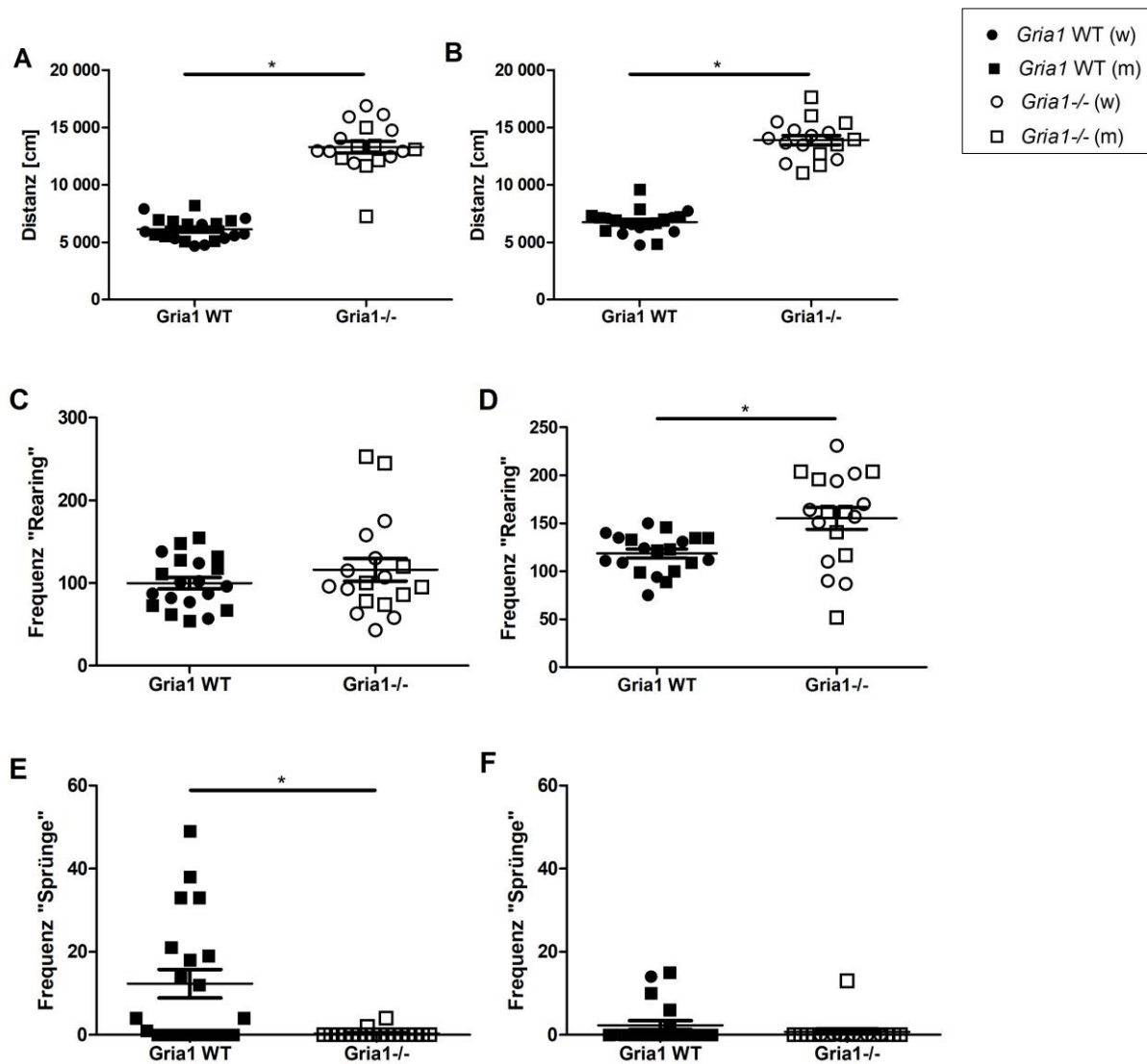


Abbildung 28. Open-Field-Test. Die Analyse der Distanz, die die Tiere zurücklegten, zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps bei präpubertären (A) und sexuell reifen (B) Tieren. Die Frequenz der Position *Rearing* unterschied sich bei präpubertären Tieren nicht zwischen den Genotypen (C). Sexuell reife *Gria1*^{-/-} Tiere richteten sich häufiger auf als *Gria1* WT Tiere (D). Präpubertäre *Gria1* WT Tiere sprangen häufiger gegen die Arenawand als *Gria1*^{-/-} Wurfgeschwister (E). Die Frequenz der „Sprünge“ sexuell reifer Tiere unterschied sich nicht zwischen den Genotypen (F). Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 8-10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

Irwin-Score

Die Analyse des Irwin-Tests demonstrierte einen signifikanten Effekt des Genotyps auf den Summenscore bei präpubertären Tieren (Abb. 29, ART ANOVA: $F_{1,34} = 9.22$, $p = 0.005$, FDR-korrigiertes $p = 0.02$): Präpubertäre *Gria1* WT Tiere hatten höhere Summenscores als *Gria1*^{-/-} Tiere (FDR-korrigiertes $p = 0.02$). Die Auswertung des Summenscores pubertärer und sexuell

reifer Tiere konnte keine Gruppenunterschiede aufzeigen (Abb. 29). Die Auswertung der einzelnen Untersuchungsparameter bei präpubertären Tieren zeigte, dass die höheren Summenscores der *Gria1* WT Tiere auf die *Handling*-assoziierten Parameter Vokalisation, Harn- und Kotabsatz zurückzuführen waren. Die Auswertung der Körperinnentemperatur präpubertärer, pubertärer und sexuell reifer Tiere konnte keine Gruppenunterschiede aufzeigen (Abb. 29).

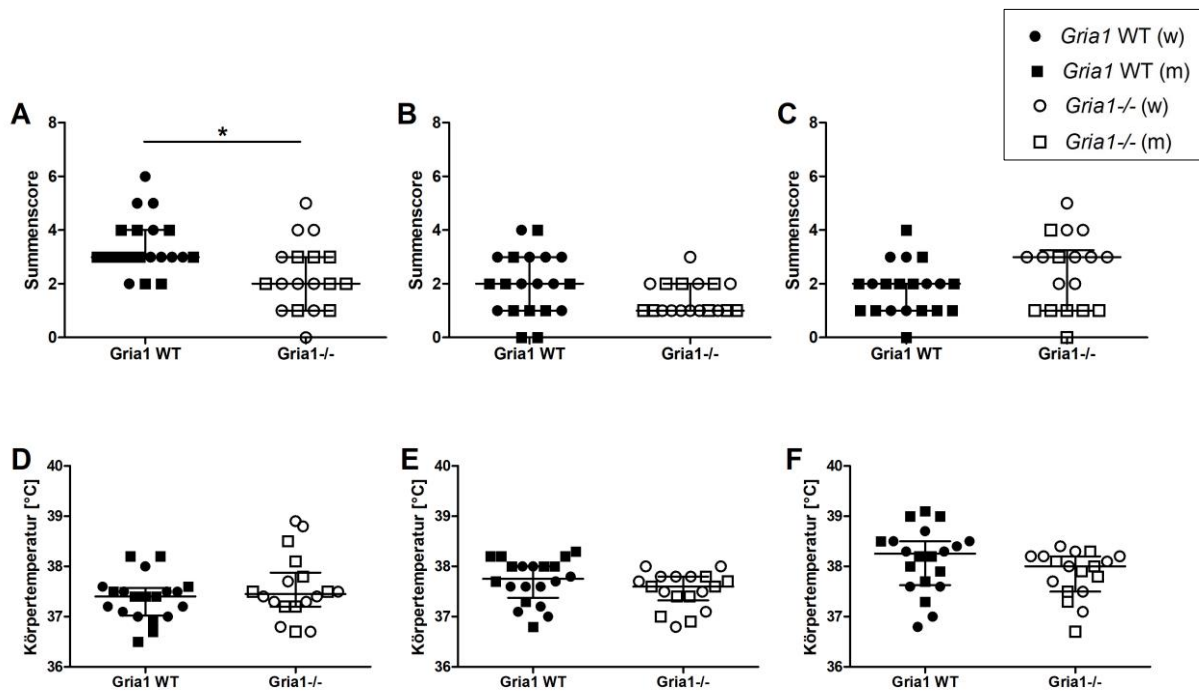


Abbildung 29. Irwin-Score und Körpertemperatur. Die Analyse des Irwin-Summscores demonstrierte einen Effekt des Genotyps bei präpubertären Tieren (A), während sich die Irwin-Gesamtpunktzahlen bei pubertären (B) und sexuell reifen (C) Tieren nicht zwischen den Genotypen unterschieden. Der Summenscore ergibt sich aus der Addition aller Einzelscores. Die Auswertung der am Ende des Irwin-Tests gemessenen Körperinnentemperatur präpubertärer (D), pubertärer (E) und sexuell reifer (F) Tiere zeigte keine Gruppenunterschiede. Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 8-10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur; Median (IQR).

Fäkale Kortikosteronmetaboliten (FCM)

Die Bestimmung der Kortikosteronmetabolitkonzentrationen in Kotproben präpubertärer Tiere konnte einen geschlechtsspezifischen Effekt des Genotyps demonstrieren (Abb. 30, ANOVA: Interaktion Genotyp x Geschlecht $F_{1,30} = 7.93$, $p = 0.009$): während die Analyse der Daten männlicher präpubertärer Tiere keine Gruppenunterschiede ergab, wiesen die Proben weiblicher *Gria1*^{-/-} Tiere höhere FCM-Konzentrationen auf als die weiblicher *Gria1* WT Tiere (Bonferroni-Korrektur: $p < 0.05$). Die Analyse der Proben sexuell reifer Tiere zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps auf die FCM-Konzentration (Abb. 30, ANOVA: Genotyp $F_{1,33} = 8.34$, $p = 0.007$): die Proben *Gria1*^{-/-} Tiere wiesen höhere FCM-Spiegel auf als die der *Gria1* WT Wurfgeschwister (FDR-korrigiertes $p = 0.03$).

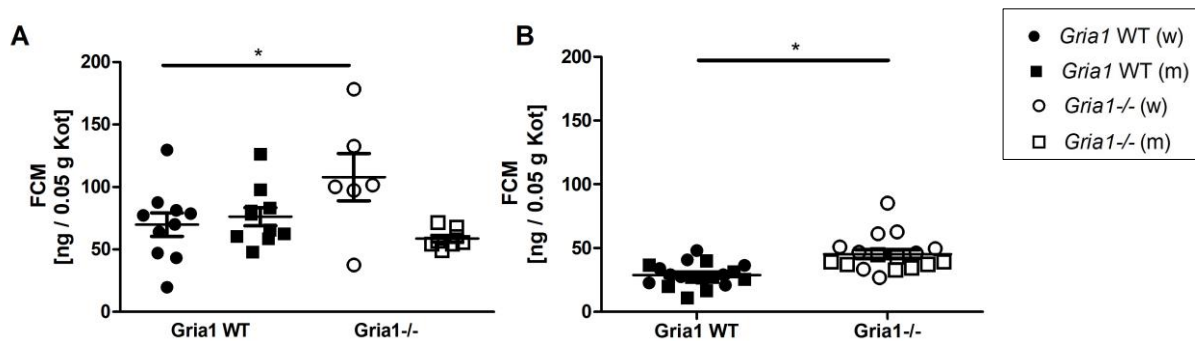


Abbildung 30. Fäkale Kortikosteronmetaboliten (FCM). Die Analyse der Proben präpubertärer (A) Tiere demonstrierte einen geschlechtsspezifischen Effekt des Genotyps auf die FCM-Konzentration. Die Auswertung der Proben sexuell reifer Tiere zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps auf den Kortikosteronmetabolitspiegel (B). Kreise symbolisieren Daten weiblicher Tiere, Rechtecke symbolisieren Daten männlicher Tiere. * $p < 0.05$. $n = 8-10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit Bonferroni-Korrektur (A) oder FDR-Korrektur (B); Mittelwert \pm SEM.

Körpergewicht

Die Auswertung der Körpergewichtsdaten konnte einen Effekt des Genotyps auf das Körpergewicht der Tiere an allen Tagen, an denen die Tiere gewogen wurden, demonstrieren (Abb. 31, ANOVAs: P21 Genotyp $F_{1,34} = 14.81$, $p = 0.0005$, FDR-korrigiertes $p = 0.003$; P23 Genotyp $F_{1,34} = 24.73$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P25 Genotyp $F_{1,34} = 20.2$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P27 Genotyp $F_{1,34} = 16.84$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P30 Genotyp $F_{1,34} = 32.9$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P36 Genotyp $F_{1,34} = 36.16$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P42 Genotyp $F_{1,34} = 38.75$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P49 Genotyp $F_{1,34} = 50.86$, $p < 0.0001$, FDR-

korrigiertes $p < 0.0001$; P55 Genotyp $F_{1,34} = 66.35$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$): dabei hatten *Gria1*^{-/-} Tiere geringere Körpergewichte als *Gria1* WT Wurfgeschwister. Eine Interaktion der Haupteffekte konnte für keinen Untersuchungszeitpunkt festgestellt werden. Ein Effekt des Geschlechts auf das Körpergewicht der Tiere konnte an allen Untersuchungstagen ab P30 demonstriert werden (Abb. 31, ANOVAs: P30 Geschlecht $F_{1,34} = 23.09$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P36 Geschlecht $F_{1,34} = 71.29$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P42 Geschlecht $F_{1,34} = 76.82$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P49 Geschlecht $F_{1,34} = 102.5$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$; P55 Geschlecht $F_{1,34} = 143.1$, $p < 0.0001$, FDR-korrigiertes $p < 0.0001$): unabhängig vom Genotyp wurden bei weiblichen Tieren ab einem Alter von 30 Tagen geringere Körpergewichte festgestellt als bei männlichen Wurfgeschwistern.

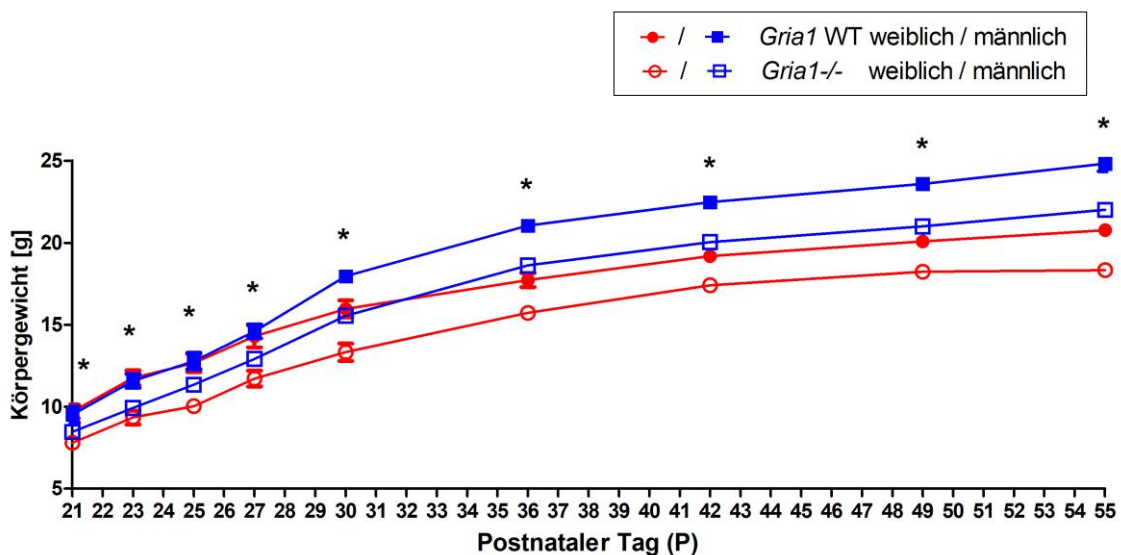


Abbildung 31. Körpergewicht. Ein signifikanter Effekt des Genotyps auf das Körpergewicht konnte an allen Tagen, an denen die Tiere gewogen wurden, festgestellt werden. * $p < 0.05$. $n = 8-10$ pro Genotyp pro Geschlecht. ANOVA mit FDR-Korrektur; Mittelwert \pm SEM.

4. Korrelations- und Hauptkomponentenanalysen

4.1 Korrelationsanalysen

Die Daten aus den Verhaltensversuchen und FCM-Analysen bei C57BL/6 Wildtyp-Mäusen, im *Scn1a*-A1783V- und *Grial*-Modell wurden Korrelationsanalysen nach Spearman unterzogen. Die Auswertung erfolgte für die Daten der C57BL/6 Wildtyp-Mäuse anhand eines kombinierten Datensatzes adoleszenter Tiere (Gruppen P25, P36 und P50; Abb. 32) sowie anhand des Datensatzes reif adulter Tiere (Gruppe P120) als adulte Kontrollgruppe (Abb. 33). Die Auswertung erfolgte für die Daten des *Scn1a*-A1783V-Modells (Abb. 34, 35) und *Grial*-Modells (Abb. 36, 37) jeweils getrennt für die Untersuchungszeitpunkte in der frühen Adoleszenz (präpubertäre Tiere) und späten Adoleszenz (sexuell reife Tiere). Die Daten weiblicher und männlicher Tiere der jeweiligen Gruppe wurden für die Spearman-Korrelationsanalysen zusammengefasst. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die analysierten Parameter und deren abgekürzte Bezeichnung für die Darstellung der Ergebnisse in den abgebildeten Korrelationsmatrices (*Heatmaps*). Eine Auflistung der Korrelationskoeffizienten (*r*-Werte) und *p*-Werte befindet sich im Anhang.

Eine besonders starke Korrelation (*cut-off*: $r \geq 0.8$ oder ≤ -0.8 , jeweils i. V. m. $p < 0.05$) wurde für die nachfolgenden Parameter festgestellt:

- C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (adoleszente Tiere):
 - BUR_Du_1 und BUR_Du_2
- C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (reif adulte Tiere):
 - Sp und VWR
- *Scn1a*-A1783V-Modell, frühe Adoleszenz / späte Adoleszenz

<ul style="list-style-type: none"> • OF_Dist und OF_Rearing • Heimk_Vel und Heimk_Dist • OF_Immobil und OF_Dist • OF_Rearing und OF_Immobil 	<ul style="list-style-type: none"> • BUR_Du_1 und BUR_Du_2 • BUR_Du_1 und Heimk_Trä • Heimk_Trä und Heimk_Dist • Heimk_Trä und Heimk_Zent • OF_Dist und OF_Rearing • OF_Dist und OF_Immobil • OF_Rearing und OF_Immobil
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- *Grial*-Modell, frühe Adoleszenz / späte Adoleszenz

• *OF_Dist* und *OF_Immobil*

• *OF_Nest* und *OF_Immobil*

• *Heimk_Vel* und *Heimk_Dist*

Tabelle 5. Überblick über die im Rahmen der Korrelationsanalyse nach Spearman analysierten Parameter. Die unter dem Punkt „Parameter“ aufgeführten Abkürzungen dienen als Legende für die *Heatmap*-Korrelationsmatrices.

<i>Parameter</i>	<i>Test</i>	<i>Beschreibung</i>
Sp	Saccharinpräferenz	Präferenz einer Saccharinlösung gegenüber Wasser in %.
BUR_Hell_1 und BUR_Hell_2 BUR_Du_1 und BUR_Du_2	Wühlverhalten Hellphase Wühlverhalten Dunkelphase	Burrowing-Test an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in der Hell- sowie Dunkelphase. Gewicht des gewählten Substrats in g.
Nest	Nestbauverhalten	Summenscore der Nestkomplexität über die viertägige (genetische Modelle) oder sechstägige (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse) Untersuchungsperiode.
VWR	Voluntary Wheel Running (Lauftradaktivität)	Zurückgelegte Gesamtdistanz im Laufrad über die viertägige (<i>Grial</i> -Modell) oder sechstägige (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse) Untersuchungsperiode.
Heimk_Dist Heimk_Vel Heimk_Futt Heimk_Trä Heimk_Zent	Heimkäfigaktivität Heimkäfigaktivität Heimkäfigaktivität Heimkäfigaktivität Heimkäfigaktivität	Zurückgelegte Distanz (Dist) in cm und Fortbewegungsgeschwindigkeit (Vel) in cm/s sowie Aufenthaltsdauer in der Futterzone (Futt), Tränkezone (Trä) und Zentrumszone (Zent) des Heimkäfigs in s. Der Test wurde für die Dauer eines 60-minütigen Zeitfensters durchgeführt.
OF_Dist OF_Immobil OF_Rearing OF_Sprünge OF_Wand OF_Zent	Open-Field-Test Open-Field-Test Open-Field-Test Open-Field-Test Open-Field-Test Open-Field-Test	Zurückgelegte Gesamtdistanz in der Arena in cm. Immobilität der Tiere in der Arena in s. Frequenz der Position <i>Rearing</i> . Frequenz der „Sprünge“ gegen die Arenawand. Aufenthaltsdauer der Tiere im Wandbereich in s. Aufenthaltsdauer der Tiere im Zentrum in s.
Irw	Irwin-Test	Summenscore des Irwin-Tests, kalkuliert durch Summation aller Einzelscores.
Temp	Körpertemperatur	Rektale Messung der Körpertemperatur am Ende des Irwin-Tests in °C.
FCM	Fäkale Kortikosteron- metabolitkonzentration	Kortikosteronmetabolitkonzentration der Kotproben in ng pro 0.05 g Kot.

4.1.1 C57BL/6 Wildtyp-Mäuse

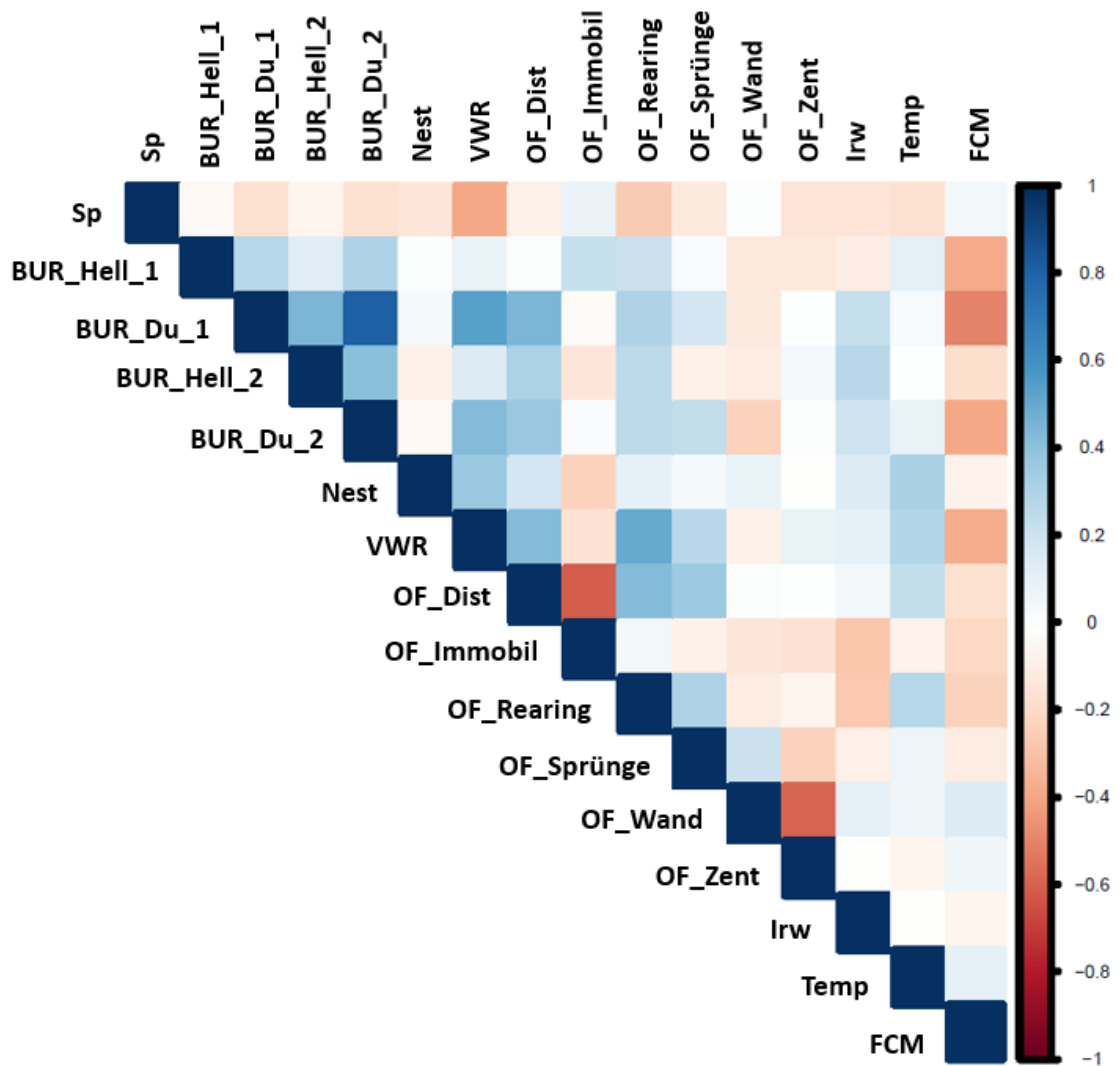


Abbildung 32. Heatmap-Korrelationsmatrix (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, Adoleszenz). Dargestellt sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman, die für den kombinierten Datensatz adoleszenter C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (Gruppen P25, P36 und P50) durchgeführt wurde ($n = 120$). Tabelle 5 schlüsselt die in dieser Abbildung verwendeten Abkürzungen auf.

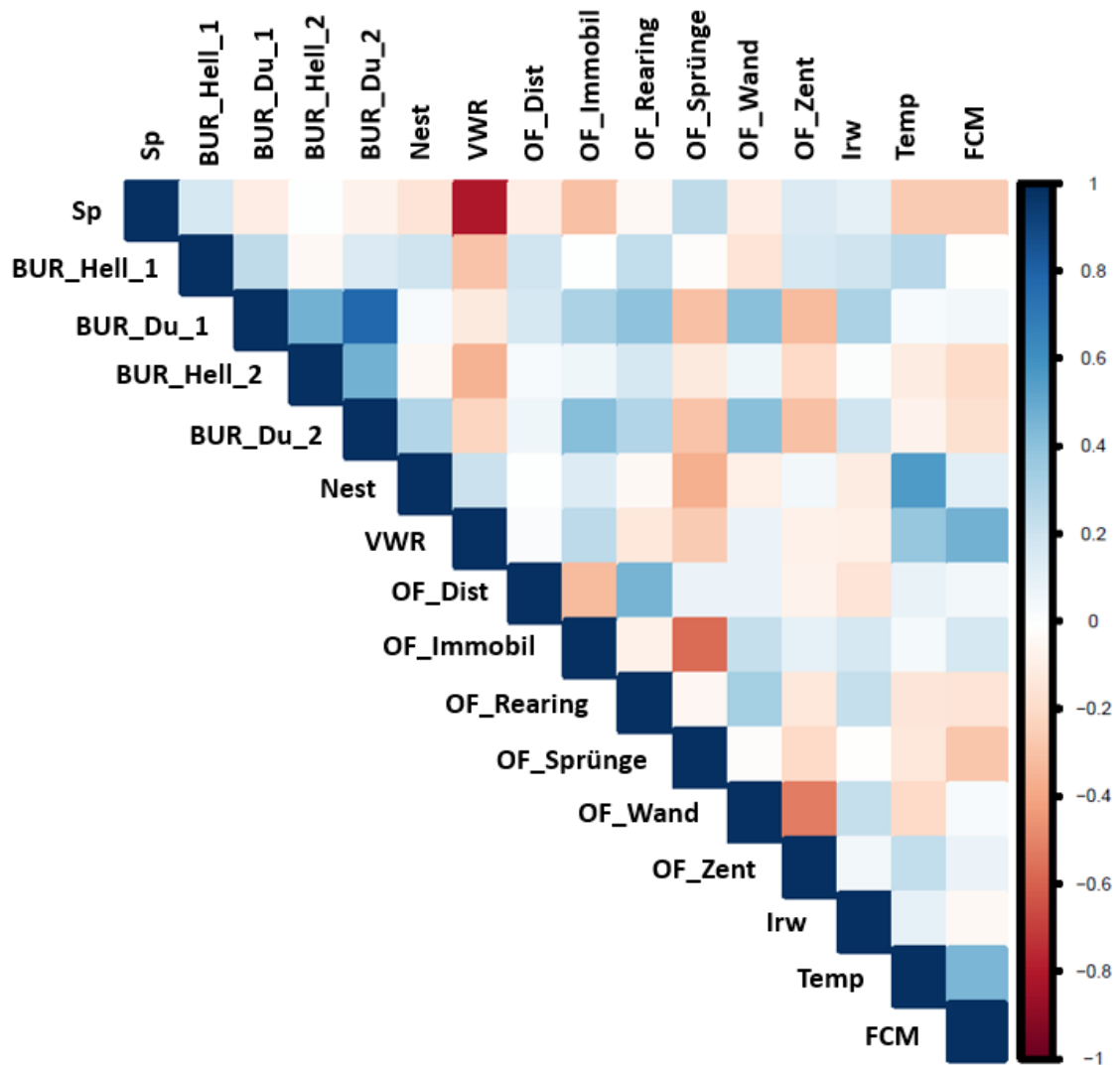


Abbildung 33. Heatmap-Korrelationsmatrix (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, adulte Tiere). Dargestellt sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman, die für den Datensatz reif adulter C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (Gruppe P120) durchgeführt wurde ($n = 40$). Tabelle 5 schlüsselt die in dieser Abbildung verwendeten Abkürzungen auf.

4.1.2 *Scn1a*-A1783V-Modell

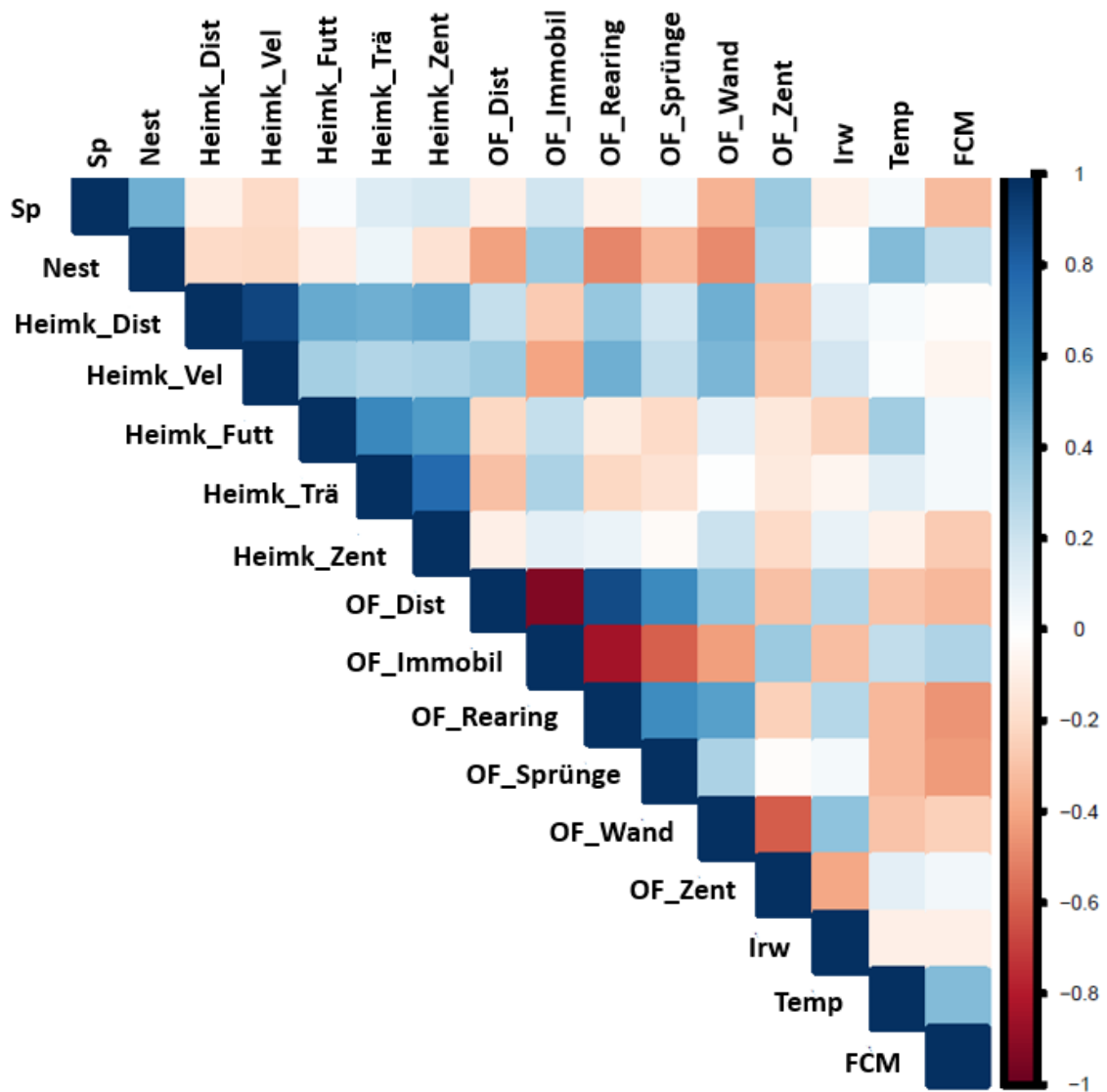


Abbildung 34. Heatmap-Korrelationsmatrix (*Scn1a*-A1783V-Modell, frühe Adoleszenz). Dargestellt sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman, die für den Datensatz präpubertärer Tiere ($n = 40$) durchgeführt wurde. Tabelle 5 schlüsselt die in dieser Abbildung verwendeten Abkürzungen auf.

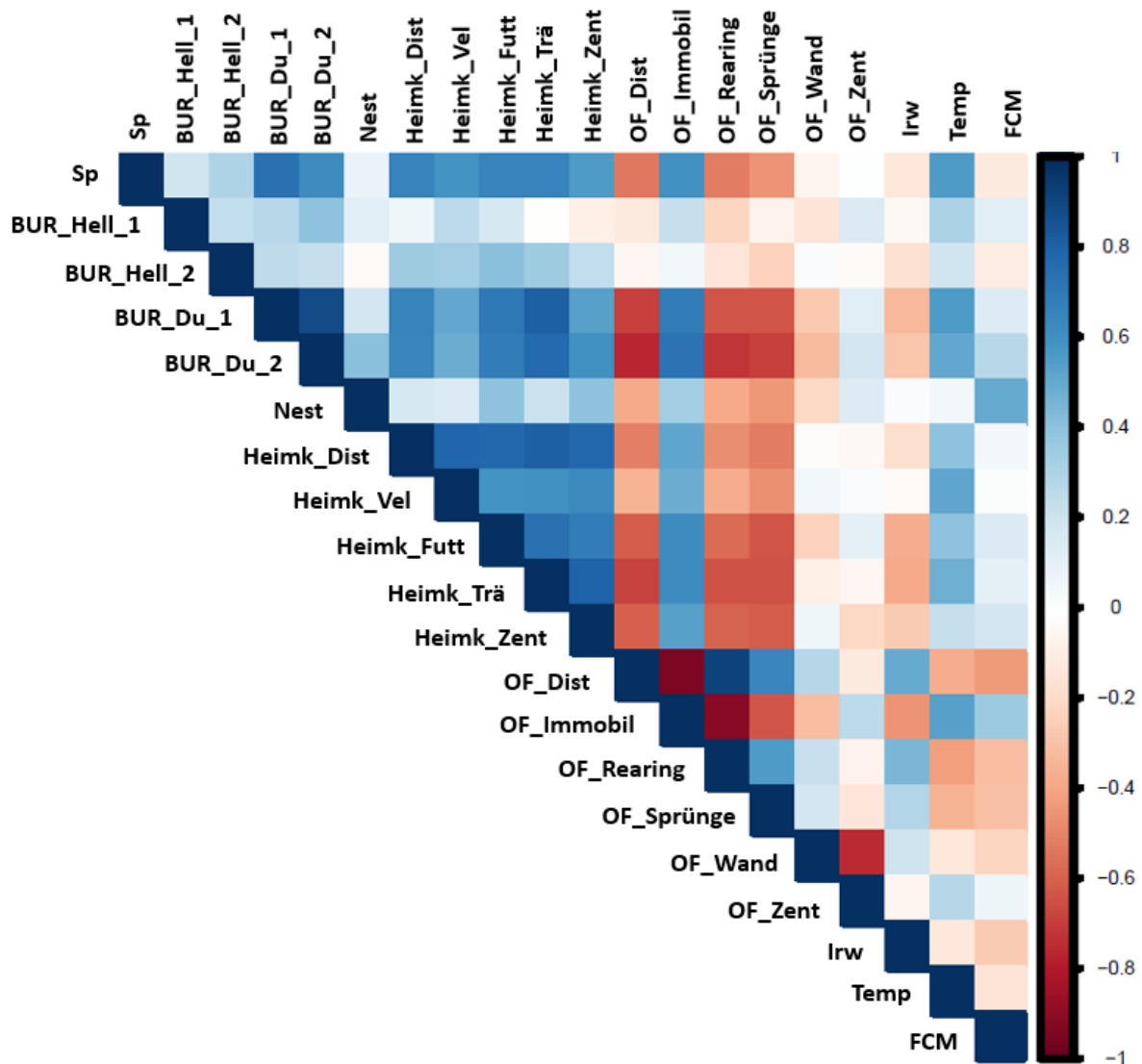


Abbildung 35. Heatmap-Korrelationsmatrix (*Scn1a*-A1783V-Modell, späte Adoleszenz). Dargestellt sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman, die für den Datensatz sexuell reifer Tiere ($n = 40$) durchgeführt wurde. Tabelle 5 schlüsselt die in dieser Abbildung verwendeten Abkürzungen auf.

4.1.3 *Gria1*-Modell

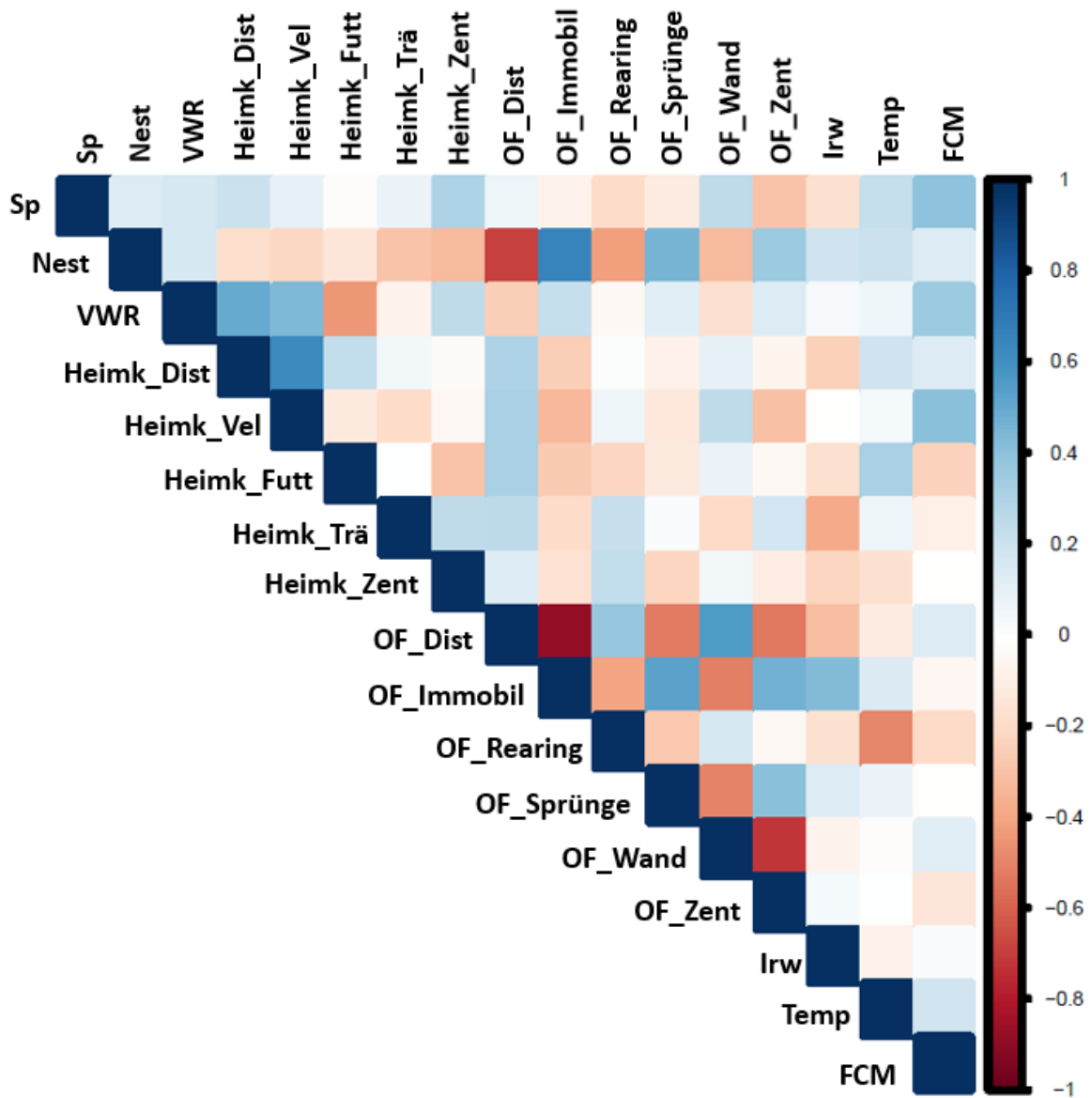


Abbildung 36. Heatmap-Korrelationsmatrix (*Gria1*-Modell, frühe Adoleszenz). Dargestellt sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman, die für den Datensatz präpubertärer Tiere ($n = 38$) durchgeführt wurde. Tabelle 5 schlüsselt die in dieser Abbildung verwendeten Abkürzungen auf.

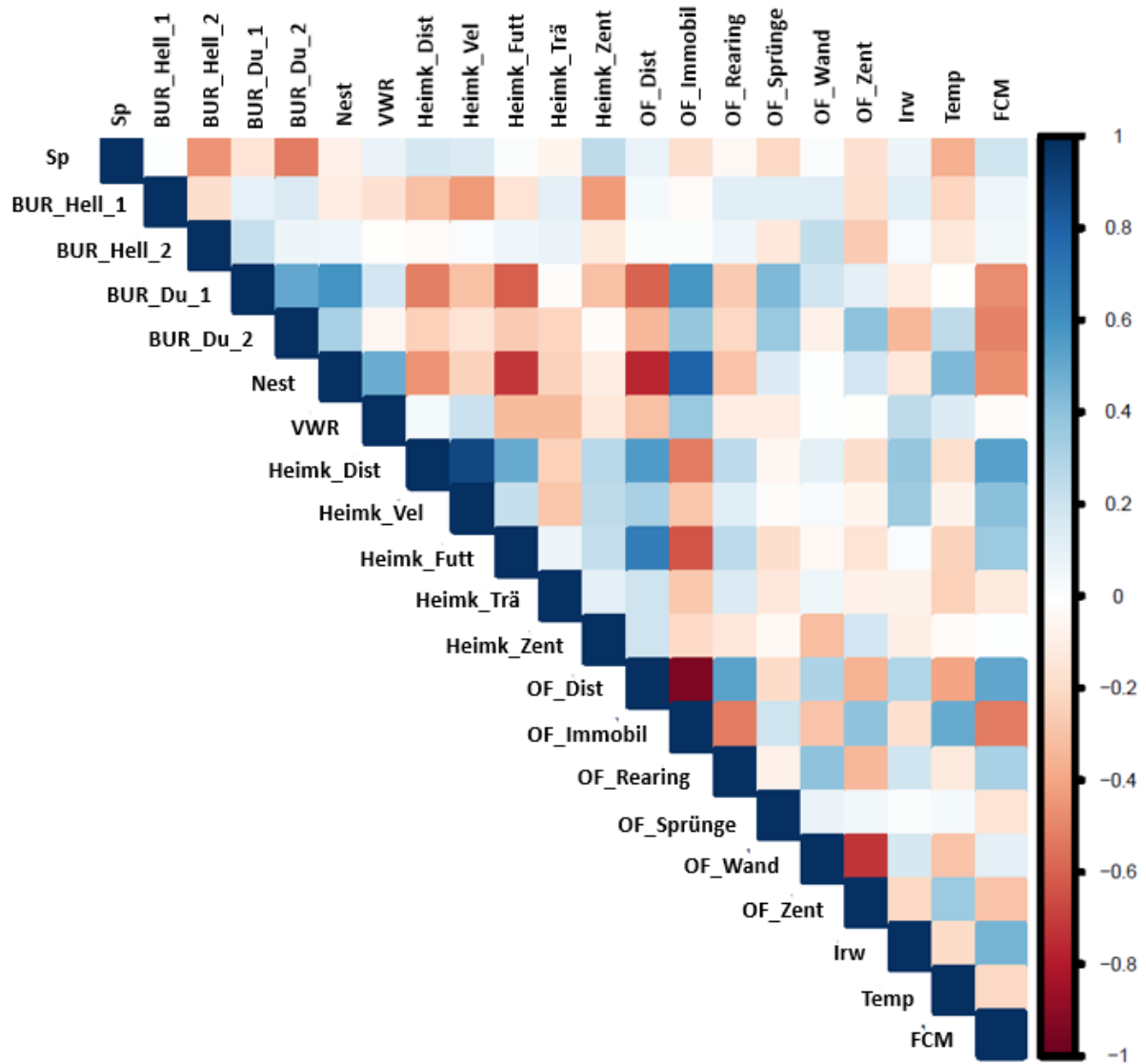


Abbildung 37. Heatmap-Korrelationsmatrix (Gria1-Modell, späte Adoleszenz). Dargestellt sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman, die für den Datensatz sexuell reifer Tiere ($n = 38$) durchgeführt wurde. Tabelle 5 schlüsselt die in dieser Abbildung verwendeten Abkürzungen auf.

4.2 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Für die Hauptkomponentenanalyse der Daten der C57BL/6 Wildtyp-Tiere wurde der gesamte Datensatz (Gruppen: P25, P36, P50, P65, P120) verwendet. Für die Daten des *Scn1a*-A1783V-Modells und des *Grial*-Modells wurden die Hauptkomponenten jeweils für den Datensatz der frühen Adoleszenz und der späten Adoleszenz analysiert. Die Kolinearität von Parametern kann zu einer Prädominanz dieser Parameter in der PCA führen. Da die beiden Open-Field-Parameter „Immobilität“ und „zurückgelegte Distanz“ modellübergreifend eine starke Korrelation bei der Analyse nach Spearman aufwiesen ($r \leq -0.8$ i. V. m. $p < 0.05$), wurde der Parameter „Immobilität“ nicht in die Hauptkomponentenanalyse miteinbezogen. Ansonsten entsprechen die Datensätze, die für die PCA verwendet wurden, denen die für die modellspezifischen Korrelationsanalysen nach Spearman verwendet wurden.

Die PCA des Datensatzes der C57BL/6 Wildtyp-Tiere zeigte, dass die ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 zusammen 34.89 % der Gesamtvarianz des Datensatzes beschreiben (Abb. 38). Die zweidimensionale Darstellung des Datensatzes lässt eine Separation der Gruppe P25 vor allem entlang PC1 erkennen. Dabei wiesen präpubertäre Tiere (P25) im Vergleich zu allen anderen Altersgruppen eine geringere interindividuelle Varianz auf. Die zweidimensionale Darstellung deutet darauf hin, dass sich die interindividuelle Varianz innerhalb einer Gruppe mit zunehmendem Alter der Tiere erhöhte und besonders groß war bei Tieren, die die sexuelle Reife erreicht hatten.

Die PCA des Datensatzes des *Scn1a*-A1783V-Modells zum Zeitpunkt der frühen Adoleszenz zeigte, dass die ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 zusammen 46.28 % der Gesamtvarianz des Datensatzes beschreiben (Abb. 38). Dabei konnte die zweidimensionale Darstellung des Datensatzes keine deutliche Separation *Scn1a*-defizienter Tiere von ihren *Scn1a* WT Wurfgeschwistern demonstrieren. Die PCA des Datensatzes des *Scn1a*-A1783V-Modells zum Zeitpunkt der späten Adoleszenz zeigte, dass die ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 zusammen 51.10 % der Gesamtvarianz des Datensatzes beschreiben (Abb. 38). Die zweidimensionale Darstellung des Datensatzes konnte eine Separation sexuell reifer *Scn1a*-defizienter Tiere von ihren *Scn1a* WT Wurfgeschwistern vor allem entlang PC1 demonstrieren. Die Darstellung des Datensatzes der *Scn1a*+/- Tiere deutet auf eine erhöhte interindividuelle Varianz bei präpubertären *Scn1a*+/- Tieren hin.

Die PCA des Datensatzes des *Grial*-Modells zum Zeitpunkt der frühen Adoleszenz zeigte, dass die ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 zusammen 38.64 % der Gesamtvarianz des Datensatzes beschreiben (Abb. 38). Dabei konnte die zweidimensionale Darstellung des Datensatzes keine deutliche Separation der *Grial*^{-/-} Tiere von ihren *Grial* WT Wurfgeschwistern demonstrieren. Die PCA des Datensatzes des *Grial*-Modells zum Zeitpunkt der späten Adoleszenz zeigte, dass die ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 zusammen 38.89 % der Gesamtvarianz des Datensatzes beschreiben (Abb. 38). Die zweidimensionale Darstellung des Datensatzes konnte eine Separation sexuell reifer *Grial*^{-/-} Tiere von ihren *Grial* WT Wurfgeschwistern vor allem entlang PC1 demonstrieren. Die Darstellung des Datensatzes der *Grial*^{-/-} Tiere deutet auf eine vergleichbar große interindividuelle Varianz bei präpubertären und sexuell reifen *Grial*^{-/-} Tieren hin.

In Tabelle 6 und 7 sind die fünf Parameter (Top-Parameter), die hauptsächlich zu einer Separation der Gruppen an PC1 und PC2 beitrugen, für die Datensätze der beiden genetischen Modelle aufgelistet. Bei den der Hauptkomponente PC1 zugeschriebenen Top-Parametern handelt es sich modellübergreifend um Parameter des Open-Field-Tests, die das Lokomotionsverhalten beschreiben können. Zusätzlich wurden Parameter des Open-Field-Tests, die das explorative Verhalten beschreiben können, bei beiden genetischen Modellen zum Zeitpunkt der frühen Adoleszenz als Top-Parameter identifiziert. Ferner wurden modell- und altersspezifisch das Nestbauverhalten, das Wühlverhalten und die Saccharinpräferenz sowie trackingbasierte Aktivitätsparameter des Heimkäfigs als besonders relevante Parameter identifiziert.

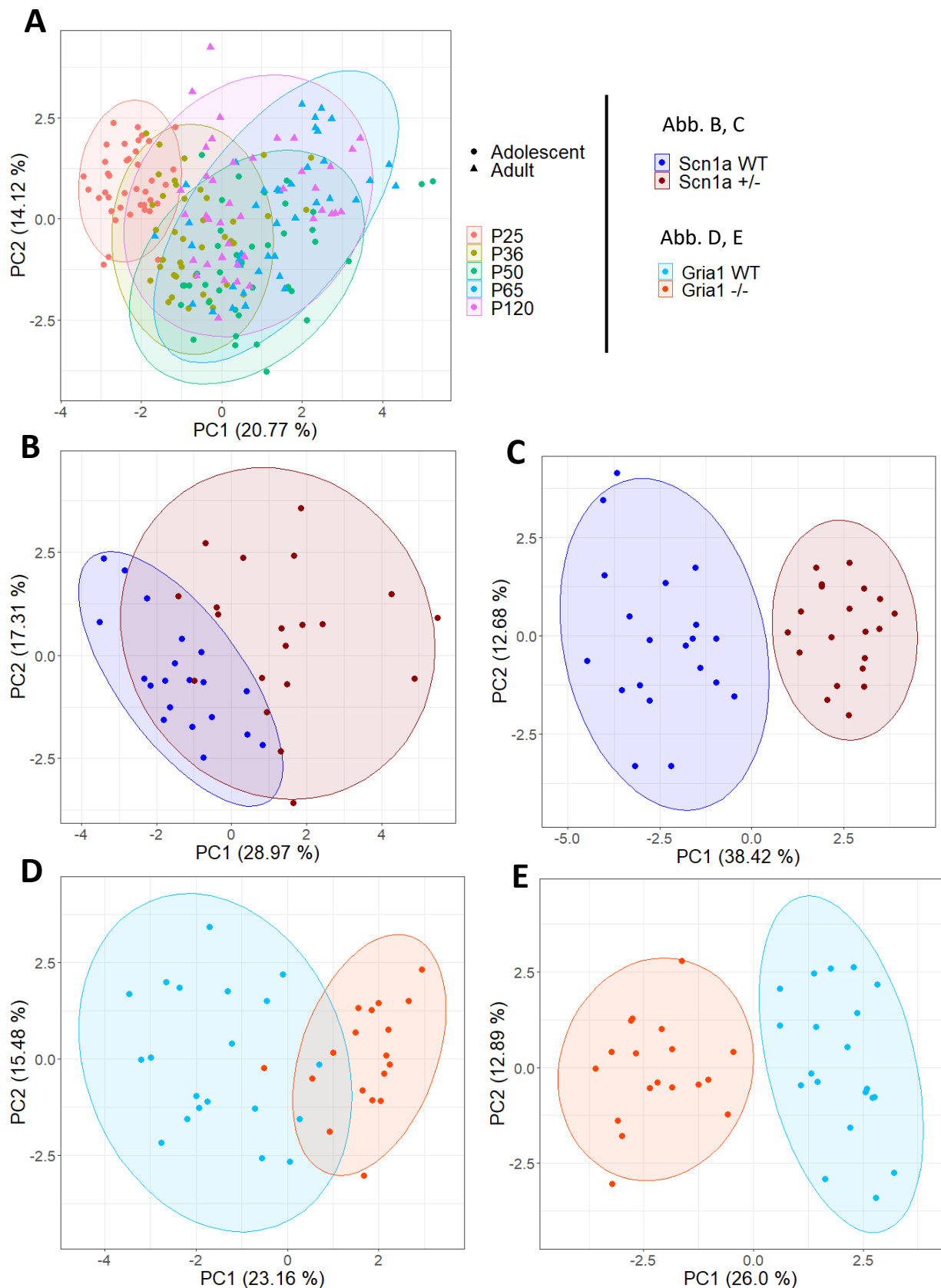


Abbildung 38. Hauptkomponentenanalyse (PCA). Dargestellt ist die Aufspaltung der Gruppen an den beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2. Jeder Punkt repräsentiert den individuellen Datensatz eines Tieres. A: C57BL/6 Wildtyp-Mäuse ($n = 200$). B: *Scn1a*-A1783V-Modell (frühe Adoleszenz, $n = 40$), C: *Scn1a*-A1783V-Modell (späte Adoleszenz, $n = 40$), D: *Gria1*-Modell (frühe Adoleszenz, $n = 38$), E: *Gria1*-Modell (späte Adoleszenz, $n = 38$).

Tabelle 6. Auflistung der top 5 Kandidatenparameter der Hauptkomponenten PC1 und PC2 für die PCA des *Scn1a*-A1783V-Modells zum Zeitpunkt der frühen und späten Adoleszenz.

Top 5 Parameter von PC1 (loading value Comp1/ loading value Comp2)	Top 5 Parameter von PC2 (loading value Comp1/ loading value Comp2)
<p>Frühe Adoleszenz</p> <p>1) OF_Dist (0.80/ 0.31) 2) OF_Rearing (0.80/ 0.23) 3) OF_Wand (0.78/ 0.06) 4) Nest (0.69/ 0.25) 5) Heimk_Vel (0.67/ 0.52)</p>	<p>Frühe Adoleszenz</p> <p>1) Heimk_Futt (0.12/ 0.77) 2) Heimk_Trä (0.10/ 0.76) 3) Heimk_Dist (0.64/ 0.65) 4) Temp (0.39/ 0.53) 5) Heimk_Vel (0.67/ 0.52)</p>
<p>Späte Adoleszenz</p> <p>1) Heimk_Futt (0.86/ 0.06) 2) Heimk_Dist (0.82/ 0.32) 3) OF_Dist (0.82/ 0.24) 4) Heimk_Trä (0.82/ 0.21) 5) Sp (0.75/ 0.20)</p>	<p>Späte Adoleszenz</p> <p>1) OF_Wand (0.32/ 0.76) 2) OF_Zent (0.30/ 0.75) 3) BUR_Hell_2 (0.45/ 0.60) 4) Heimk_Zent (0.64/ 0.47) 5) Heimk_Dist (0.82/ 0.32)</p>

Tabelle 7. Auflistung der top 5 Kandidatenparameter der Hauptkomponenten PC1 und PC2 für die PCA des *Gria1*-Modells zum Zeitpunkt der frühen und späten Adoleszenz.

Top 5 Parameter von PC1 (loading value Comp1/ loading value Comp2)	Top 5 Parameter von PC2 (loading value Comp1/ loading value Comp2)
<p>Frühe Adoleszenz</p> <p>1) OF_Dist (0.89/ 0.2) 2) OF_Zent (0.74/ 0.28) 3) OF_Wand (0.73/ 0.14) 4) Nest (0.68/ 0.40) 5) OF_Sprünge (0.59/ 0.14)</p>	<p>Frühe Adoleszenz</p> <p>1) Heimk_Vel (0.41/ 0.72) 2) VWR (0.34/ 0.62) 3) FCM (0.21/ 0.60) 4) Heimk_Dist (0.34/ 0.54) 5) Heimk_Trä (0.14/ 0.51)</p>
<p>Späte Adoleszenz</p> <p>1) OF_Dist (0.90/ 0.25) 2) Heimk_Dist (0.78/ 0.26) 3) Nest (0.76/ 0.16) 4) Heimk_Futt (0.71/ 0.19) 5) BUR_Du_1 (0.69/ 0.45)</p>	<p>Späte Adoleszenz</p> <p>1) OF_Zentrum (0.50/ 0.64) 2) OF_Wand (0.28/ 0.63) 3) BUR_Hell_1 (0.02/ 0.59) 4) Heimk_Zent (0.03/ 0.59) 5) Temp (0.39/ 0.49)</p>

V. DISKUSSION

Genetisch veränderte Mäuse können bereits im jungen Alter Verhaltensveränderungen aufweisen, die auf ein herabgesetztes Wohlbefinden der Tiere hindeuten können und modellspezifische Belastungsspitzen offenbaren (SUKOFF RIZZO & CRAWLEY, 2017). Im Rahmen dieses Dissertationsprojekts sollte daher eine heimkäfingbasierte Verhaltenstestbatterie entwickelt und validiert werden, die Aussagen über die laborspezifische, kumulative Belastung und die Augenscheinvalidität von Mausmodellen in der neurowissenschaftlichen Forschung ermöglicht.

1. C57BL/6 Wildtyp-Mäuse

Im Rahmen der Untersuchungen des ersten Teilprojekts bei Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6JRj konnte ein Einfluss des Alters sowie des Geschlechts auf zahlreiche der untersuchten Parameter festgestellt werden.

Die Untersuchungen zur Präferenz einer süßen Lösung zeigten, dass Tiere aller Altersgruppen die Saccharinlösung gegenüber dem zeitgleich angebotenen Wasser bevorzugten. Die Daten zeigten zudem, dass sich die stärkere Süßpräferenz, die bei Tieren in der frühen Adoleszenz detektiert wurde, mit dem Erreichen der sexuellen Reife dem Niveau der erwachsenen Kontrollgruppen angleich. Eine erhöhte Süßpräferenz der präpubertären und pubertären Tiere kann mit dem erhöhten Energiebedarf der Tiere in der Wachstums- und Entwicklungsphase begründet werden: das Tier versucht, den erhöhten Energiebedarf über die Aufnahme der süßen Lösung zu decken. Untersuchungen zum Zuckerkonsum bei Kindern und Jugendlichen haben demonstriert, dass die Präferenz für Süßes mit dem Erreichen der sexuellen Reife der Heranwachsenden abnahm (VENDITTI et al., 2020). Bei den Daten der präpubertären und pubertären Tiere sticht die geringe Varianz ins Auge. Dies ist auffällig, denn gemeinhin ist die Varianz bei Verhaltensuntersuchungen junger Tiere, bei denen sich der Eintritt in verschiedenen Entwicklungsphasen (transient) individuell unterscheiden kann, höher als bei adulten Tieren (BRUST et al., 2015; ELTOKHI et al., 2020). Eltokhi und Kollegen (2021) konnten bereits einen Einfluss des Alters sowie des Stammes auf die Präferenz für eine Saccharoselösung bei adoleszenten Mäusen demonstrieren. Ansonsten sind für Untersuchungen zur Süßpräferenz im Sinne des

klassischen Verhaltensparadigmas nach Crawley (CRAWLEY, 2006) bei jungen und adoleszenten Mäusen nur limitierte Daten verfügbar (RAINEKI et al., 2012; ELTOKHI et al., 2021). Wenn jungen Tieren süße Lösungen verabreicht wurden, so lag der Fokus vor allem darauf, die Auswirkungen eines erhöhten Zuckerkonsums bei Kindern und Jugendlichen am NagermodeLL zu untersuchen [bspw. (REICHELt et al., 2016; NANEIX et al., 2018)] oder die Effekte erhöhter Zuckeraufnahme im Zusammenhang mit dem altersspezifischen Alkoholkonsumverhalten bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen zu untersuchen (WILMOUTH & SPEAR, 2009; AGOGLIA et al., 2016; KAMENS et al., 2018). Es gibt Hinweise, dass sich die Süßpräferenz junger Tiere speziesspezifisch unterscheiden kann: So war die Süßpräferenz bei vier bis sechs Monate alten Kaninchen der Rasse Neuseeländer geringer ausgeprägt als bei den reif adulten Tieren dieser Rasse (DRESHFIELD & BERRY, 1994). Die vorliegenden Daten bei jungen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6JRj sprechen dafür, dass der Einsatz des Saccharinpräferenz-Tests bei jungen Mäusen bereits ab dem präpubertären Alter praktikabel ist, um Hinweise auf anhedonie- oder schmerzassoziierte Verhaltensweisen bei Mäusen (CRAWLEY, 2006; DE LA PUENTE et al., 2015) zu erhalten. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass eine stammspezifische Präferenz für Saccharose bei jungen Mäusen mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6N, DBA/2 und FVB/N beschrieben wurde (ELTOKHI et al., 2021): Eltokhi und Kollegen (2021) demonstrierten, dass präpubertäre und pubertäre Wildtyp-Mäuse des Stamms DBA/2 eine geringere Saccharosepräferenz aufwiesen als Wildtyp-Mäuse der Stämme C57BL/6N und FVB/N.

Die im Rahmen der Wühlaktivitätsanalyse erhobenen Daten zeigten ein deutlich erhöhtes Aktivitätsniveau bei den beiden Dunkelphasentests, während die Tiere bei beiden Hellphasentests ein fast konstant niedriges Wühlaktivitätsniveau an den Tag legten. In beiden Dunkelphasen-Tests erreichten präpubertäre Tiere niedrigere Wühlaktivitätswerte als alle Vergleichsgruppen. Dies spricht dafür, dass die im Rahmen der Burrowing-Tests gemessene Wühlaktivität der präpubertären Tiere kein relevantes Niveau erreichte und präpubertäre Tiere die angebotenen Pellets nicht in relevantem Umfang aus der Flasche beförderten und im Käfig verteilten. Obgleich die Wühlaktivität bei pubertären Tieren bereits höher war als bei präpubertären Tieren, so war sie im Vergleich zur jung adulten Gruppe immer noch

herabgesetzt. Die Wühlaktivitätsdaten spät-adoleszenter (sexuell reifer), jung adulter und adulter Tiere unterschieden sich dahingegen statistisch nicht. Die Daten lassen somit den Rückschluss zu, dass das mit dem beschriebenen Protokoll gemessene Wühlaktivitätsniveau im Verlauf der Adoleszenz der Tiere zunahm. Die Tiere zeigten mit Erreichen der sexuellen Reife ein stabiles, relevant erhöhtes Wühlaktivitätsniveau. Neben dem Eintritt in die Phase der sexuellen Reife, die mit einem erhöhten Aktivitätsniveau einhergehen kann (BRUST et al., 2015), kann auch das Körpergewicht einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilisierung der Wühlleistung gehabt haben. Mit Blick auf mögliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern konnten keine relevanten Wühlaktivitätsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren gezeigt werden. Geschlechtsunterschiede im Wühlverhalten sind für verschiedene Labornagerspezies beschrieben, bei der Labormaus sind diese jedoch gering ausgeprägt (DEACON, 2009). Im Hinblick auf die Tageszeit ist ein besonders hohes Wühlaktivitätsniveau in der Dunkelphase beschrieben (DEACON, 2009). Dabei sollte beachtet werden, dass die Messung der Wühlaktivität der Mäuse bei dem verwendeten Testaufbau durch die Menge an angebotenen Wühlsubstrat gedeckelt ist (DEACON, 2009). Eltokhi und Kollegen (2020) beschrieben bereits, dass adoleszente Wildtyp-Mäuse der Stämme C57BL/6N, FVB/N und DBA/2 im Alter von 31 Tagen eine relevante Wühlaktivität zeigten, wobei die Wühlleistung über Nacht von Wildtyp-Mäusen des Stammes FVB/N die Wühlleistung von Wildtyp-Mäusen der Stämme C57BL/6N und DBA/2 übertraf (ELTOKHI et al., 2020). Bei der Betrachtung der verminderten Wühlaktivität der präpubertären und pubertären Gruppen sollte neben der Altersphase und dem Gewicht der Tiere und der damit einhergehenden physiologischen Limitationen beim Wühlen und Befördern der Futterpellets auch ein Einfluss des verwendeten Substrats selbst beachtet werden – bspw. Größe, Gewicht und Beschaffenheit (Textur): es ist beschrieben, dass sich die Präferenz des Wühlsubstrats zwischen verschiedenen Labornagerspezies (evaluiert bei adulten Tieren) unterscheidet (DEACON, 2009). Insofern legen die Daten nahe, dass der Burrowing-Test nach dem hier verwendeten Protokoll für den Einsatz bei jungen, bereits sexuell reifen Mäusen besonders geeignet ist. Für den Einsatz bei jüngeren Tieren ist eine Modifikation des Testprotokolls in Betracht zu ziehen und weitergehend zu prüfen.

Die Daten zur Analyse des Nestbauverhaltens zeigten, dass bereits präpubertäre

Tiere unter Verwendung des beschriebenen Protokolls messbare und relevante Nestbauaktivität zeigten. Während Elthoki und Kollegen (2020) keine relevante Nestbauaktivität bei adoleszenten Mäusen der Stämme C57BL/6N, FVB/N und DBA/2 detektierten, gibt es einige Studien, in denen die Ausübung von Aktivitäten zum Nestbau bereits bei jungen Mäusen verschiedener Stämme kurz nach dem Absetzen vom Muttertier demonstriert werden konnte [bspw. (MOY et al., 2004; CORDER et al., 2020)]. Von besonderer Bedeutung sind beim nichtmaternalen Nestbauverhalten Geschlechtsunterschiede, die mehrfach vorbeschrieben sind (Jirkof 2014). Während die vorliegende Analyse keinen altersspezifischen Geschlechtsunterschied aufzeigen konnte, erzielten die Nester weiblicher Tiere – unabhängig vom Lebensalter der Tiere – höhere Komplexitätsscore als die der männlichen Tiere. Die Ergebnisse sollten auch vor dem Hintergrund interpretiert werden, dass alle Jungtiere Nestmaterial ab dem Zeitpunkt des Absetzens an P21 erhielten und von da an im Turnus mit dem wöchentlichen Umsetzen neues Nestmaterial zur Verfügung hatten. Somit hatten Tiere, die in der Präpubertät an P25 in den Versuch gingen, die kürzeste „Trainingszeit“ und die „Trainingszeiten“ zwischen den Versuchsgruppen unterschieden sich deutlich. Dies sollte bei der Interpretation der Nestbauleistung der jüngeren Gruppen entsprechend positiv berücksichtigt werden. Weiter können Körpergröße, Körpergewicht und Muskelmasse limitierende Faktoren sein, die zu geringeren Nestscores bei jüngeren Mäusen beitragen können. Grundsätzlich sind bei der Bewertung der Nestbauaktivität in Labortierhaltungen auch der Einfluss tierhaltungsspezifischer Umweltbedingungen (gefühlte Temperatur, Zugluft) zu berücksichtigen.

Die Laufradaktivitätsanalyse über die viertägige Untersuchungsperiode konnte anhand der von den Tieren täglich zurückgelegten Distanz aufzeigen, dass das Laufrad von den Tieren aller Altersgruppen vom ersten Versuchstag an angenommen wurde. Ins Auge sticht mit Blick auf die Unterschiede zwischen den Altersgruppen, dass Tiere mit Erreichen der sexuellen Reife (P50) – unabhängig vom Geschlecht – deutlich größere Distanzen zurücklegten als präpubertäre und reif adulte Tiere. Hervorzuheben ist zudem, dass weibliche Tiere unabhängig vom Alter bemerkenswert größere Gesamtdistanzen in der viertägigen Untersuchungsperiode zurücklegten als männliche Tiere. Bezüglich der Adaptationszeit wurde für adulte C567BL/6J Mäuse bereits beschrieben, dass die Tiere unmittelbar nach Einsetzen in die Käfige das Laufrad nutzten (HÄGER et al.,

2018). Dennoch ist das Fehlen einer Adaptationsphase an das Laufrad bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen. Für adulte C57BL/6J Mäuse, die eine 14-tägige Adaptationsphase an das Laufrad erhielten, ist das Erreichen eines Leistungsplateaus nach neun Tagen beschrieben (HÄGER et al., 2018). Bowen und Kollegen (2016) schlagen eine kürzere, aber geschlechtsspezifische Adaptationszeit für adulte C57BL/6J Mäuse vor, da männliche Tiere bereits nach drei Tagen und weibliche Tiere nach acht Tagen stabile Leistungsniveaus hinsichtlich der im Laufrad zurückgelegten Distanz und der Dauer der Laufradaktivität zeigten. Mit Blick auf die detektierten markanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren, so ist ein ausgeprägter Geschlechtsdimorphismus für die Laufradaktivität der Labormaus vorbeschrieben, wobei weibliche Tiere deutlich größere Distanzen im Rad zurücklegten und länger im Rad liefen als männliche Tiere (BOWEN et al., 2012; BARTLING et al., 2017). Auch von einer Altersabhängigkeit des Geschlechtsunterschieds (Abnahme mit zunehmendem Lebensalter der weiblichen und männlichen Mäuse) wurde berichtet (BARTLING et al., 2017). Gordon und Corbitt (2015) beschrieben, dass präpubertäre C57BL/6J Mäuse noch keine Geschlechtsunterschiede zeigten hinsichtlich der Dauer, die die Tiere im Rad liefen sowie der Latenzzeit bis zur Nutzung des Laufrads (GORDON & CORBITT, 2015). Bei der Interpretation der Distanz ist die physische Konstitution der Tiere mit den Faktoren Größe und Muskelmasse und die damit verbundene Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium zu berücksichtigen. Hier kann die Erfassung der Dauer, die das Einzeltier im Laufrad beim Laufen verbringt, wertvolle zusätzliche Informationen liefern, die nicht im selben Maße wie die Distanz durch die vorgenannten Faktoren beeinflusst werden. Diese Analyse setzt eine artefaktfreie Einzeltierererkennung voraus (BARAN et al., 2022). Hinsichtlich des Testaufbaus ist interessant, dass eine prägnante negative Korrelation von Laufradaktivität und Saccharinpräferenz – beides Verhaltensweisen, für die die Tiere eine hohe intrinsische Motivation aufweisen – bei reif adulten C57BL/6 Wildtyp-Mäusen detektiert werden konnte. Wie für adulte Mäuse bereits beschrieben [bspw. (OTSUKA et al., 2015; PAGLIUSI et al., 2020; SARTORI et al., 2020)], kann sich die physische Ertüchtigung der Tiere im Laufrad mildernd auf einen depressionsassoziierten Phänotyp der Tiere auswirken. Obgleich ein Konterkarieren beider Tests für den gemeinsamen Datensatz adoleszenter C57BL/6 Wildtyp-Mäuse nicht gezeigt werden konnte, sollte die parallele Testsituation bei der Interpretation der

Ergebnisse der Verhaltenstestbatterie auch bei jungen Mäusen beachtet werden.

Die heimkäfgebasierten Untersuchungen sollten mit Informationen über lokomotorische Aktivität und Explorationsverhalten aus dem Open-Field-Test sowie mit Untersuchungen über Veränderungen des Allgemeinzustands mit Fokus auf das vegetative Nervensystem der Tiere im Rahmen des klassischen Irwin-Tests ergänzt werden. Beim Open-Field-Test stellen die Arenen ein für die Tiere unbekanntes Set-up dar und die Aktivitätsdaten sind daher trotz Adaptationszeit unter besonderer Berücksichtigung der für die Tiere unbekanntem Stimuli zu interpretieren. Hinsichtlich der Gesamtdistanz, die die Tiere in der Testzeit zurücklegten, konnte nur eine erniedrigte Distanz der präpubertären Tiere im Vergleich zu allen älteren Gruppen demonstriert werden. Bezüglich lokomotorischer Aktivitätsdaten aus dem Open-Field-Test ist eine progressive Aktivitätszunahme im Laufe der Adoleszenz beschrieben (BRUST et al., 2015). Analog zur Interpretation der im Laufrad zurückgelegten Distanz ist hier das physische Entwicklungsstadium als besondere Limitation zu berücksichtigen. In geringerem Maße abhängig von Körpergewicht und Muskelmasse der Tiere ist der Parameter *Rearing*: die Häufigkeit, mit der sich die Tiere während des Tests auf den Hinterbeinen aufrichten (*Position Rearing*) kann zusätzliche Informationen über das Aktivitäts- und Explorationsverhalten der Tiere liefern (STURMAN et al., 2018), jedoch kann eine Verminderung der *Rearing*-Frequenz auch als Zeichen schmerzassoziierten Verhaltens (im Besonderen: abdominale Schmerzen) beim Nager gewertet werden [bspw. (STURMAN et al., 2018; DURST et al., 2021)]. Die detektierte Zunahme der *Rearing*-Frequenz bei den C57BL/6 Wildtyp-Mäusen im Laufe der Adoleszenz kann als Zeichen ansteigender lokomotorischer Aktivität gewertet werden (vertikale Aktivität). Diese spiegelt sich auch in der Zunahme der zurückgelegten Distanz (horizontale Aktivität) der C57BL/6 Wildtyp-Mäuse im Laufe der Adoleszenz wider. Hinsichtlich der Untersuchung des Explorationsverhaltens, auf das die Lichtverhältnisse einen starken Einfluss haben können (POST et al., 2011), wurde die Beleuchtung mit 12 bis 20 lux in einem so niedrigen Bereich gewählt, dass der Aufenthalt der Tiere in den verschiedenen Zonen der Arena nicht im Sinne eines klassischen Tests für angstassoziiertes Verhalten [bspw. (CAROLA et al., 2002; KULESSKAYA & VOIKAR, 2014; SEIBENHENER & WOOTEN, 2015)] interpretiert werden muss. Während die Analyse der Aufenthaltsdauer der Tiere im Zentrum der Arena keine Unterschiede

zwischen den Altersgruppen zeigte, wurden zahlreiche geschlechtsspezifische Altersunterschiede hinsichtlich der von den Tieren gezeigten Thigmotaxis festgestellt: bei weiblichen Tieren nahm die Ausprägung des thigmotaktischen Verhaltens graduell mit zunehmendem Alter ab. Geschlechtsunterschiede bei der Ausprägung des thigmotaktischen Verhaltens (weibliche Tiere zeigten stärkere Thigmotaxis im Open-Field-Test als männliche Tiere) sind bei adulten Mäusen eines Swiss Albino Outbred Stammes bereits beschrieben (LEPPÄNEN et al., 2006). Bei klassischen Testprotokollen des Open-Field-Tests werden oft nur die Ergebnisse der Zentrumszone berichtet, die Aussagen über angstassoziiertes Verhalten ermöglichen können, aber thigmotaktisches Verhalten, zu dessen Analyse die Arena in zumindest drei Bereiche (Zentrumszone, mittlere Zone, Wandzone) unterteilt werden sollte, nicht betrachtet. Zusammenfassend unterstreicht der vorliegende Datensatz des Open-Field-Tests, dass die Parameter *Rearing* und Thigmotaxis neben der klassischen Analyse lokomotorischer Aktivität besonders bei heranwachsenden Tieren wertvolle alters- und geschlechtsspezifische Informationen liefern können.

Die Daten des Irwin-Tests, der Aufschluss über den Allgemeinzustand und das vegetative Nervensystem der Tiere geben können, zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der von den Tieren erreichten Summenscores auf. Bei genauerer Betrachtung einzelner Parameter, die sich zwischen einzelnen Altersgruppen unterscheiden (bspw. Vokalisation und Harnabsatz), fiel auf, dass es sich hierbei nur um *Handling*-assoziierte Parameter handelte. Es gibt Hinweise, dass sich verschiedene Techniken und die Frequenz des *Handlings* geschlechtsspezifisch auf den Disstress, den weibliche und männliche Tiere hierbei erfahren, auswirken können (SENSINI et al., 2020): erste Daten implizieren, dass häufiges *Tail-Handling* bei männlichen Tieren mit einem höheren Disstress-Niveau assoziiert ist als bei weiblichen Tieren, wobei das *Tunnel-Handling* unabhängig vom Geschlecht der Tiere gegenüber dem klassischen *Tail-Handling* von den Tieren bevorzugt wurde (SENSINI et al., 2020). In den drei Teilprojekten wurden alle Tiere über klassisches *Tail-Handling* manipuliert, wobei das *Handling* der Tiere auf das absolut notwendige Minimum reduziert wurde. Interessanter Weise unterschied sich die Körperinnentemperatur der Tiere, die am Ende des Irwin-Tests erfasst wurde, altersspezifisch zwischen den Geschlechtern. Wie bereits für adulte Mäuse des Stammes C67BL/6J vorbeschrieben (SANCHEZ-ALAVEZ et al., 2011),

wiesen weibliche Tiere ab Erreichen der sexuellen Reife in der späten Adoleszenz (P50) höhere Körpertemperaturen auf als die altersgleichen männlichen Tiere. Da die Körpertemperatur im Rahmen des Irwin-Tests rektal erfasst wurde, ist der von den Tieren beim *Handling* und im zuvor durchlaufenen Open-Field-Test erfahrene Disstress als wesentlicher Einflussfaktor auf die Basaltemperatur der Tiere zu berücksichtigen.

In Ergänzung zu den Verhaltensuntersuchungen sollten über die Analyse der Kortikosteronmetaboliten aus den Kotproben der Tiere auf nichtinvasive Weise Informationen über die adrenokortikale Aktivität der Tiere gesammelt werden. Es gibt bislang nur eine limitierte Anzahl an Studien zur adrenokortikalen Aktivität bei jungen Mäusen (KOLBE et al., 2015; BAILOO et al., 2018; BAILOO et al., 2020). Es wurden jedoch bereits altersspezifische Veränderungen der Kortikosteronmetabolitkonzentrationen bei Mäusen detektiert (KOLBE et al., 2015; BAILOO et al., 2018). Die ab der sexuellen Reife der Tiere festgestellten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren (höhere FCM-Spiegel in Proben weiblicher Tiere) sind für adulte Mäuse bereits beschrieben worden (TOUMA et al., 2003; TOUMA et al., 2004; BAILOO et al., 2020). Die erhöhten Basalkonzentrationen bei präpubertären Tieren beider Geschlechter sollten auch vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass die Prozedur des Absetzens und Umgruppierens an P21 ein erhöhtes Disstress-Niveau der Tiere verursachen kann (BAILOO et al., 2020). Zudem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass erhöhte Kortikosteronmetabolitkonzentrationen – besonders bei jungen Tieren – auch Ausdruck erhöhter metabolischer Aktivität sein können (BUWALDA et al., 2011; KOOLHAAS et al., 2011) und daher für sich alleinstehend keine Aussage über den Disstress-Pegel der jungen Tiere zulassen.

Bei der Betrachtung des gesamten Datensatzes der C57BL/6 Wildtyp-Mäuse konnte eine Zunahme der interindividuellen Varianz im Verlauf der Adoleszenz gezeigt werden. Zusammenfassend haben sich die im Rahmen des ersten Teilprojekts untersuchten Kandidatenparameter für den Einsatz bei heranwachsenden Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6JRj ab dem präpubertären Alter als geeignet erwiesen – eine Ausnahme hiervon stellt der Test des Wühlverhaltens dar. Die Ergebnisse legen nahe, dass sich das verwendete Protokoll zur Analyse des Wühlverhaltens für den Einsatz bei jungen Mäusen eignet, die die sexuelle Reife bereits erreicht haben. Die grundsätzliche Eignung

der Kandidatenparameter für junge Wildtyp-Mäuse – unter besonderer Beachtung der physiologischen Limitationen – erlaubt jedoch keine Aussage über die Sensitivität der Tests bei jungen Tieren. Der Einsatz der Verhaltenstestbatterie sollte stets unter Berücksichtigung modellspezifischer Besonderheiten in ggf. modifizierter Form erfolgen.

2. *Scn1a*-A1783V-Modell

Im Rahmen des zweiten Teilprojekts konnten anhand der untersuchten Kandidatenparameter Verhaltensveränderungen bei jungen Mäusen des *Scn1a*-A1783V-Modells zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Laufe der Individualentwicklung der Tiere festgestellt werden. Dabei wurden für eine Vielzahl der Parameter ein Einfluss des *Scn1a*-Genotyps detektiert. Für einige der Parameter war der Einfluss des *Scn1a*-Genotyps zudem geschlechtsspezifisch ausgeprägt.

Während die Untersuchungen zur Saccharinpräferenz keine Gruppenunterschiede in der frühen Adoleszenz der Tiere demonstrierten, zeigten die Untersuchungen in der späten Adoleszenz eine Reduktion der Süßpräferenz in Abhängigkeit vom *Scn1a*-Genotyp. Vorangegangene Untersuchungen im *Scn1a*-A1783V-Modell konnten bereits eine reduzierte Saccharinpräferenz sieben bis zehn Wochen alter *Scn1a*^{+/-} Mäuse im Vergleich zu ihren *Scn1a* WT Wurfgeschwistern nachweisen (MILJANOVIC et al., 2021b). Die vorliegenden Ergebnisse sollten vor dem Hintergrund interpretiert werden, dass alle Jungtiere zwischen P14 und P26 eine mit Glukoselösung supplementierte Aufbaunahrung erhielten und schwachen Tieren in den ersten Tagen nach dem Absetzen vom Muttertier zusätzlich Glukoselösung per Handfütterung verabreicht wurde. In der früh-adoleszenten Phase kann bei den belasteten Tieren die Aufnahme der süßen Saccharinlösung auch auf Energiedefizite zurückgeführt werden, die mit der erhöhten Anfallsfrequenz einhergehen können. Die Tiere versuchen, über die süße Saccharinlösung ihren erhöhten Energiebedarf zu decken. Die bei sexuell reifen *Scn1a*^{+/-} Tieren festgestellte reduzierte Saccharinpräferenz kann sowohl auf veränderte metabolische Bedürfnisse bedingt durch die *Scn1a*-Haploinsuffizienz und / oder auf eine verminderte Genussfähigkeit im Sinne einer Interpretation nach Crawley hinweisen (CRAWLEY, 2006; KLEIN et al., 2015). Das Vorkommen

dieses anhedonieassoziierten Verhaltens in der späten Adoleszenz der Tiere muss daher als Hinweis auf eine mögliche kumulative Belastung des *Scn1a*-A1783V-Modells interpretiert werden. Die Relevanz dieses Parameters wird zudem von den Ergebnissen der altersspezifischen Hauptkomponentenanalyse im *Scn1a*-A1783V-Modell unterstrichen. Dies sollte vor dem Hintergrund gesehen werden, dass Depressionen eine der häufigsten Komorbiditäten bei adulten sowie jugendlichen Patienten mit Epilepsien darstellen (SNOEIJEN-SCHOUWENAARS et al., 2019; SCOTT et al., 2020) und auch bei Patienten mit Dravet-Syndrom zu einer erheblichen Belastung und Einschränkung der Lebensqualität führen können (BRUNKLAUS et al., 2011; VILLAS et al., 2017; LAGAE et al., 2018; SCOTT et al., 2020). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Saccharinpräferenztest besonders im chronischen Nagermodell mit neuropsychiatrischer Relevanz wertvolle Hinweise zur Belastungseinstufung bei heranwachsenden Tieren liefern kann.

Die Analysen des Wühlverhaltens und des Nestbauverhaltens können ergänzend Aufschluss über Verhaltensweisen geben, für die die Tiere eine hohe intrinsische Motivation zeigen (DEACON, 2012; JIRKOF, 2014). Wühl- und Nestbauverhalten können dann als sogenannte „positive Indikatoren“ bei einer Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere bereits frühzeitig verändert sein (JIRKOF, 2014). Bei adulten Tieren des *Scn1a*-A1783V-Modells konnte bereits eine Reduktion des Wühl- und Nestbauverhaltens in Abhängigkeit vom *Scn1a*-Genotyp demonstriert werden (MILJANOVIC et al., 2021b). Die Analysen der Burrowing-Tests zeigten ein konstant niedriges Wühlaktivitätsniveau der sexuell reifen *Scn1a*+/- Tiere sowohl in den Hell- als auch in den Dunkelphasen. Im Vergleich zu den Daten der *Scn1a* WT Wurfgeschwister konnte mit dem ersten Burrowing-Test in der Dunkelphase eine Reduktion des Wühlverhaltens *Scn1a*-defizienter Tiere nur bei männlichen Tieren festgestellt werden, während die Wühlleistung in der darauffolgenden Dunkelphase bei *Scn1a*+/- Tieren unabhängig vom Geschlecht erniedrigt war.

Die Analyse des Nestbauverhaltens zeigte Unterschiede in Abhängigkeit vom *Scn1a*-Genotyp bereits bei präpubertären Tieren auf, wobei sich diese nicht im Summenscore niederschlugen. Bei sexuell reifen Tieren konnte dahingegen ein geschlechtsspezifischer Einfluss des *Scn1a*-Genotyps auf den Nestsummenscore ermittelt werden: während sich die Nester sexuell reifer männlicher Tiere nicht

unterschieden, zeigten weibliche *Scn1a*^{+/-} Tiere im Vergleich zu ihren weiblichen *Scn1a* *WT* Wurfgeschwistern eine limitierte Nestbauaktivität. Geschlechtsspezifische Unterschiede beim nichtmaternalen Nestbauverhalten sind für Wildtyp-Mäuse verschiedener Stämme beschrieben (DEACON, 2006a). Wühl- und Nestbauaktivitäten können als für die jungen und adulten Tiere komplexe und anspruchsvolle täglich ausgeübte Aktivitäten betrachtet werden (GASKILL et al., 2012; GOLD, 2012; JIRKOF, 2014). Die Analyse des Nestbauverhaltens erwies sich als kontinuierliches Monitoring zur Verlaufskontrolle bei chronischen Nagermodellen bereits als besonders aufschlussreich [bspw. (BOLDT et al., 2021; MILJANOVIC et al., 2021b; BUCHECKER et al., 2022)]. Die Analyse des Wühlverhaltens, das für die Bewertung schmerzassoziierter Verhaltensveränderungen im Nagermodell validiert wurde [bspw. (ANDREWS et al., 2012; RUTTEN et al., 2014; WODARSKI et al., 2016)], konnte mit dem hier verwendeten Protokoll dahingegen nur Ergebnisse aus einem Zeitfenster von zwei Tagen im Leben der Tiere repräsentieren. Obwohl das Wühlverhalten in der ersten Dunkelphase im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse als einer der Top-Parameter identifiziert wurde, die zur Separation der sexuell reifen *Scn1a*^{+/-} Tiere von ihren *Scn1a* *WT* Wurfgeschwistern beitrugen, kann die Analyse des Wühlverhaltens mit dem hier durchgeführten Protokoll als „Momentaufnahme“ in besonderem Maße von zirkadianen Rhythmusstörungen der Tiere beeinflusst worden sein. Bei der Bewertung des Nestbau- und Wühlverhaltens sollte daher besonderes Augenmerk auf den Aktivitätsstatus der Tiere gelegt werden, da diese Parameter koordinierte Verhaltensmuster voraussetzen (JIRKOF, 2014). Koordinierte Verhaltensmuster können von einer Hyperlokomotion oder erhöhten motorischen Reaktivität auf neu Stimuli des Tiermodells negativ beeinflusst werden, wie Koivisto und Kollegen (2019) bereits bei jungen Tieren eines genetisch veränderten Mausmodells für die Alzheimer-Krankheit demonstrierten. Auch die negative Korrelation von Wühlverhalten und zurückgelegter Distanz im Open-Field-Test gibt einen Hinweis auf den Einfluss erhöhter stimuliinduzierter Aktivität auf das Wühlverhalten. Unter Beachtung der vorgenannten Limitationen, können die Saccharinpräferenz, das Wühlverhalten und das Nestbauverhalten bei jungen Tieren des *Scn1a*-A1783V-Modells als Komplex für Verhaltensweisen gesehen werden, für die die Tiere eine hohe intrinsische Motivation aufweisen und deren Reduktion daher auf eine limitierte Genussfähigkeit und ein beeinträchtigt Wohlbefinden der Tiere hindeutet (CRAWLEY, 2006). Die

Heimkäfigaktivitätsdaten wiesen auf eine Hypolokomotion sexuell reifer *Scn1a*^{+/-}-Tiere während des 60-minütigen Untersuchungsfensters hin. Dahingegen lieferten die Aktivitätsdaten präpubertärer Tiere ein uneinheitliches Bild. Sexuell reife *Scn1a*^{+/-}-Tiere verbrachten dabei weniger Zeit in der Futter- und Tränkezone als ihre *Scn1a* WT Wurfgeschwister. Aussagen über den generellen Aktivitätsstatus der Tiere sollten aus der Analyse dieses kurzen Zeitfensters nicht abgeleitet werden. Jedoch kann die verminderte Heimkäfigaktivität der *Scn1a*^{+/-}-Tiere zu einem Zeitpunkt, zu dem unbelastete Tiere höchste Aktivitätslevel zeigen – hier: kurz nach Beginn der Dunkelphase – einen Hinweis auf das Vorkommen zirkadianer Rhythmusstörungen in dem Modell geben. Die längere Aufenthaltsdauer weiblicher *Scn1a* WT Tiere in der Zentrumszone im Vergleich zu weiblichen *Scn1a*^{+/-}-Tieren deckt sich mit der festgestellten höheren Gesamtaktivität der *Scn1a* WT Tiere zur Untersuchungszeit. Bei der Bewertung der Aufenthaltsdauer in der Zentrumszone des Käfigs sollte berücksichtigt werden, dass der PhenoTyper-Käfig über einen geschlossenen, dunkelgrünen Aufsatz mit integrierter Kameraeinheit verfügt. Anders als herkömmliche Käfige, die oben über einen Gitteraufsatz geschlossen werden, ist der PhenoTyper-Käfig nach oben hin komplett geschlossen und die Zentrumszone stellt so einen für die Tiere „geschützteren“ Bereich dar. Daher kann die kürzere Aufenthaltsdauer weiblicher sexuell reifer *Scn1a*^{+/-}-Tiere in der Zentrumszone als Konsequenz der erniedrigten Gesamtaktivität interpretiert werden und sollte nicht per se als gesteigertes angstassoziiertes Verhalten interpretiert werden.

Die Daten des Open-Field-Tests zeigten eine horizontale und vertikale Hyperlokomotion der *Scn1a*^{+/-}-Tiere zu beiden Untersuchungszeitpunkten. So kann das vermehrte Aufrichten (*Rearing*) der *Scn1a*^{+/-}-Tiere, das stark positiv mit der von den Tieren zurückgelegten Distanz korreliert war, als Zeichen erhöhter lokomotorischer Aktivität im Sinne einer vertikalen Hyperlokomotion gewertet werden. Eine Hyperlokomotion adulter *Scn1a*^{+/-}-Tiere des *Scn1a*-A1783V-Modells konnte bereits von unserer Arbeitsgruppe demonstriert werden (MILJANOVIC et al., 2021b). Hinsichtlich der Sprünge der Tiere gegen die Arenawand, die von einer verblindeten Person über die Gesamtdauer des Tests gescort wurden, sprangen *Scn1a*^{+/-}-Tiere – unabhängig vom Geschlecht – sowohl in der frühen als auch in der späten Adoleszenz öfter gegen die Arenawand als ihre *Scn1a* WT Wurfgeschwister. Die Sprünge gegen die Arenawand können – auch vor

dem Hintergrund der positiven Korrelation mit anderen Parametern der Lokomotion im Open-Field – als Zeichen erhöhter lokomotorischer Aktivität interpretiert werden. Weiter können die Sprünge Versuche darstellen, aus der Arena zu entkommen und über die Arenawand zu springen. In diesem Zusammenhang spricht die erhöhte Sprungfrequenz für ein verändertes Explorationsverhalten und kann auf eine verminderte Fähigkeit, Risiken einzuschätzen, hindeuten. Bahceci und Kollegen (2020) haben bereits eine verstärkte Ausprägung der Thigmotaxis bei adoleszenten *Scn1a*^{+/-} Mäusen berichtet (BAHCECI et al., 2020). Ein erhöhtes Niveau thigmotaktischen Verhaltens konnte bei Tieren des *Scn1a*-A1783V-Modells im Rahmen dieser Studie nur bei präpubertären *Scn1a*^{+/-} Tieren festgestellt werden. Hinsichtlich der Belastungseinschätzung der Tiere sollte berücksichtigt werden, dass sich gleich mehrere Parameter aus dem Open-Field-Test (Distanz, *Rearing*, Thigmotaxis) unter den Top-Parametern der Hauptkomponentenanalyse wiederfinden, die zu einer signifikanten Separation der genetisch veränderten Gruppe von den Wildtyp-Gruppe entlang PC1 beitrugen. Dies unterstreicht den Informationsgehalt insbesondere der vorgenannten drei Parameter aus dem Open-Field-Test in Ergänzung zu einer heimkäfıg-basierten Untersuchungsreihe für die Belastungseinschätzung der jungen Mäuse. Die Ergebnisse der altersspezifischen Hauptkomponentenanalyse deuten zudem darauf hin, dass eine Veränderung des Explorationsverhaltens besonders bei sehr jungen Tieren in der frühen Adoleszenz zu berücksichtigen ist.

Der Irwin-Test wurde vor, während und nach dem Open-Field-Test durchgeführt. Im *Scn1a*-A1783V-Modell konnte eine Erhöhung der Summenscores in Abhängigkeit vom *Scn1a*-Genotyp in der mittleren und späten Adoleszenz festgestellt werden. Die Erhöhung des Summenscores konnte dabei auf Parameter zurückgeführt werden, die nach dem Open-Field-Test erhoben wurden und im Zusammenhang mit dem *Handling* der Tiere standen. So zeigten sich erhöhte Reizbarkeit und vermehrte Schreckhaftigkeit bei Berührung der *Scn1a*^{+/-} Tiere, während die Daten zur *Handling*-assoziierten Vokalisation und zum *Handling*-assoziierten Harnabsatz ein uneinheitliches Bild zeigten. Bei der Bewertung ist besonders der Einfluss des vorausgegangenen *Handlings* der Tiere zu berücksichtigen. Auch die intensive Pflege schwacher Tiere nach dem Absetzen der Jungtiere vom Muttertier, die mit frequentem *Handling* der schwachen Tiere einherging, ist hier von besonderer Bedeutung. Bei der Interpretation der

Körpertemperaturdaten müssen die für die Messung erforderliche Fixierung und das im Rahmen des Irwin-Tests vorausgegangene *Handling* der Tiere als Einflussfaktoren berücksichtigt werden. Ein Einfluss des *Scn1a*-Genotyps auf die Regulation der Basalkörpertemperatur wurde im Zusammenhang mit der temperaturabhängigen Anfallsinduktion beschrieben (SAHAI et al., 2021).

Interessanter Weise konnte die Analyse der Kortikosteronmetaboliten aus den Fäzes präpubertärer und sexuell reifer Tiere keine Unterschiede zwischen den Genotypen zeigen. Die Analyse konnte jedoch einen vom Genotyp unabhängigen Geschlechtsunterschied aufzeigen: in den Proben weiblicher Tiere wurden höhere Konzentrationen detektiert als in den Proben männlicher Tiere, was für adulte Labormäuse bereits beschrieben wurde (TOUMA et al., 2003; TOUMA et al., 2004; BAILOO et al., 2020).

Anhand der Körpergewichtsdaten der Tiere konnte eine geschlechtsunabhängige Reduktion des Körpergewichts von *Scn1a*^{+/-} Mäusen am Tag des Absetzens an P19 sowie an P21 demonstriert werden. Während männliche *Scn1a*^{+/-} Tiere über die gesamte Untersuchungsperiode hinweg ein reduziertes Körpergewicht hatten, konnte die Analyse der Daten weiblicher Tiere eine Gewichtsreduktion in Abhängigkeit vom *Scn1a*-Genotyp bis P27 feststellen. Ein reduziertes Körpergewicht junger und adulter *Scn1a*^{+/-} Mäuse des *Scn1a*-A1783V-Modells wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits festgestellt (MILJANOVIC et al., 2021b). Die vorliegenden Körpergewichtsdaten können zum einen als Zeichen einer Entwicklungsverzögerung bei Tieren des *Scn1a*-A1783V-Modells gewertet werden. Zum anderen ist jedoch der Körperbau der Tiere normal, sodass ein transient erniedrigter *body condition score* und transient erniedrigte Körpergewichte auch auf eine maternale Vernachlässigung zurückgeführt werden können. Für einen Einfluss des maternalen Verhaltens und gegen eine klare Entwicklungsverzögerung bei Tieren beider Geschlechter spricht auch die Tatsache, dass die belasteten weiblichen Tiere im Verlauf der Adoleszenz rasch zunahmten. Die Analyse der Daten weiblicher Tiere konnte ab P30 keine Gewichtsunterschiede in Abhängigkeit vom *Scn1a*-Genotyp mehr feststellen. Bei der Interpretation sollte beachtet werden, dass der Hypothalamus eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Energiestoffwechsels spielt und auch Veränderungen des zirkadianen Rhythmus zu starker Gewichtszunahme führen können (ENGIN, 2017). Bei weiblichen Ratten wurde über eine exzessive Gewichtszunahme während einer

längeren Phase des Aufkindelns der basolateralen Amygdala mit wiederholter Anfallsinduktion berichtet (LÖSCHER et al., 2003).

Die als Pilotprojekt durchgeführte Wärmebildvideoüberwachung konnte die Absonderung einzelner Jungtiere von der Gruppe darstellen. Die Separation war besonders ausgeprägt bei Jungtieren, die unter einer höheren Anfallsfrequenz litten. Prospektiv könnte heimkäfigbasiertes Monitoring von Muttertier und Wurf unter Einbeziehung der verschiedenen Käfigzonen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt Aufschluss über die Beeinträchtigung des Wohlbefindens von (einzelnen) Jungtieren sowie Hinweise auf Veränderungen des maternalen Verhaltens geben. Neben der Belastung, die das Jungtier in Folge der genetischen Defizienz erfährt, kann auch die hier beobachtete Vernachlässigung sich absondernder Tiere durch das Muttertier Einfluss auf die physische und psychische Entwicklung der Tiere haben (GERECSEI et al., 2018). Bei Epilepsiemodellen kann eine Wärmebildgestützte Überwachung im Heimkäfig von besonderer Bedeutung sein mit dem Ziel einer sofortigen, automatisierten Detektion von Anfallsaktivität. Ferner kann die automatisierte Bildauswertung auch Hinweise auf eine Hypothermie der belasteten Tiere liefern, die interiktal bei separierten Jungtieren aufgrund des erniedrigten Körperkontakts sowie aufgrund eines Energiedefizits bestehen kann. Das verwendete Wärmebildmodul erwies sich für automatisierte Untersuchungen zur Detektion von Hyper- und Hypothermie der Tiere als nicht geeignet aufgrund des zu geringen Auflösungsvermögens. Aus den Beobachtungen der maternalen Fürsorge lässt sich jedoch ableiten, dass die im *Scn1a*-A1783V-Modell von unserer Arbeitsgruppe festgestellte Mortalität von 40 % (MILJANOVIC et al., 2021a) – die meisten Tiere verstarben zwischen P19 und P26 – nicht als Konsequenz der mit dem Absetzen entzogenen mütterlichen Fürsorge interpretiert werden sollte. Abgesehen von SUDEP kann die Mortalität innerhalb dieses Zeitfensters auch als Konsequenz einer verminderten selbstständigen Futteraufnahme gewertet werden. Die selbstständige Futteraufnahme kann durch ein eingeschränktes Orientierungsvermögen sowie ein herabgesetztes Allgemeinbefinden der frisch abgesetzten *Scn1a*^{+/-} Tiere reduziert sein. Zudem trugen die erhöhte Anfallsfrequenz sowie stimuliinduzierte Hyperlokomotion der *Scn1a*^{+/-} Tiere (Stimuli: neue Umgebung des Käfigs, offene Haltung, Licht, Geräusche) zum Energiedefizit der belasteten Tiere bei. Die engmaschige Verabreichung von Glukoselösung und mit Glukoselösung supplementierter elektrolytreicher

Aufbaunahrung kann dazu beigetragen haben, dass die Mortalität des *Scn1a*-A1783V-Modells im Rahmen der Zucht für dieses Dissertationsprojekt auf 10 % reduziert werden konnte.

Die Untersuchungen an den heranwachsenden Mäusen des *Scn1a*-A1783V-Modells zeigten, dass die Tiere einen klinisch nachweisbar nachteiligen Phänotyp sowie für die Belastungseinschätzung relevante Verhaltensveränderungen aufwiesen. Hinsichtlich des klinischen Phänotyps zeigten die Tiere ein reduziertes Körpergewicht im Verlauf der Entwicklung, epileptische Anfälle – die bereits vor dem Absetzen vom Muttertier auftraten – sowie Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens bei den Untersuchungen des Irwin-Tests in der mittleren und späten Adoleszenz. Es ist davon auszugehen, dass die Tiere die epileptischen Anfälle nicht bei Bewusstsein erleben und sich innerhalb weniger Minuten vom Anfallsgeschehen erholen. Hinsichtlich der Verhaltensveränderungen konnten transiente Beeinträchtigungen des Nestbauverhaltens in der frühen und späten Adoleszenz sowie eine transiente Beeinträchtigung des Wühlverhaltens in der späten Adoleszenz gezeigt werden. Die Ergebnisse des Saccharinpräferenztests können darauf hindeuten, dass sich die erfahrene Belastung kumulativ als Folge des Syndroms aufbaut und sich diese ab der späten Adoleszenz als anhedonieassoziiertes Verhalten manifestierte. Neben dem Wühlverhalten und der Saccharinpräferenz wurden vor allem Parameter des Open-Field-Tests im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse als relevant identifiziert. Die Daten des Open-Field-Tests sprechen für eine klar ausgeprägte Hyperlokomotion, die negativ mit dem Wühlverhalten im Heimkäfig korreliert war. Dies spricht dafür, dass die Verhaltensveränderungen zu einem hohen Grad stimuliinduziert und damit transient und beeinflussbar im Laufe der Entwicklung bei den Tieren auftreten. Die Ergebnisse sprechen daher für eine laborspezifische Einstufung der Linie B6(Cg)-*Scn1a*^{tm1.1Dsf/J} x 129S1/Sv-Hprt^{tm1(cre)Mnn/J} in den Schweregrad „mittel“.

Die Ergebnisse verdeutlichen zudem die bereits im Grundsatzpapier des Bf3R vorgeschlagene Notwendigkeit der modellspezifischen Anpassung der Untersuchungszeitpunkte (Bf3R, 2016). Hieraus ergibt sich die Empfehlung, dass die Untersuchungszeitpunkte bei allen genetischen Mausmodellen mit potenzieller entwicklungsneurologischer Pathophysiologie angepasst werden sollten. Dabei sollten auch die frühe postnatale Phase vor dem Absetzen der Jungtiere sowie das maternale Verhalten intensiver berücksichtigt werden.

3. *Gria1*-Modell

Im Rahmen des dritten Teilprojekts konnten anhand der untersuchten Kandidatenparameter Verhaltensveränderungen bei jungen Mäusen mit GluA1-Defizienz im Verlauf der Adoleszenz bestätigt werden, die vom *Gria1*-Genotyp der Tiere beeinflusst wurden. Weiter konnte für einige der untersuchten Parameter ein geschlechtsspezifischer Einfluss des *Gria1*-Genotyps auf den Phänotyp der jungen Tiere nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der Saccharinpräferenz der Tiere konnten weder in der frühen noch in der späten Adoleszenz genotyp- oder geschlechtsbedingte Unterschiede festgestellt werden. Die Beteiligung des GluA1-Rezeptors an der Süßpräferenz und seine Rolle bei der hedonischen Bewertung einer süßen Lösung wurden bei adulten *Gria1*^{-/-} Mäusen bereits evaluiert (Austen 2017, Strickland 2021). Während ein Effekt der GluA1-Defizienz auf den Konsum einer süßen Lösung (AUSTEN et al., 2017) und auf deren hedonische Bewertung (STRICKLAND et al., 2021) nicht festgestellt werden konnte, konnte im Rahmen einer Clusteranalyse eine reduzierte Aufnahmefrequenz der süßen Lösung im Zusammenhang mit der GluA1-Defizienz gezeigt werden (STRICKLAND et al., 2021). Eine signifikante negative Korrelation der Saccharinpräferenz mit der Laufradaktivität wurde von Maksimovic und Kollegen (2014) bei adulten Wildtyp-Mäusen beschrieben: bei gleichzeitigem Angebot eines Laufrads verringerten die Tiere den Konsum einer Saccharinlösung. Die Korrelationsanalyse der Daten junger *Gria1*^{-/-} Tiere und ihrer *Gria1* WT Wurfgeschwister ergab keinen Hinweis auf eine signifikante Korrelation beider Parameter.

Im Gegensatz zum Saccharinpräferenztest konnten die Analysen des Wühl- und Nestbauverhaltens als weitere heimkäfgebasierte Verhaltensparameter einen Effekt des *Gria1*-Genotyps aufzeigen. Das Wühlverhalten der *Gria1*^{-/-} Mäuse war während der beiden Dunkelphasen in der Spätadoleszenz reduziert. Bannerman und Kollegen (2004) berichteten bereits über eine Limitierung der Wühlleistung bei adulten *Gria1*^{-/-} Mäusen der Linie B6N.129-*Gria1*^{tm1Rsp/J}.

Hinsichtlich des Nestbauverhaltens zeigte sich ein Effekt des *Gria1*-Genotyps auf die Komplexitätsscores der Nester von Tieren in der frühen sowie späten Adoleszenz. Hinsichtlich eines geschlechtsspezifischen Effekts des Genotyps (DEACON, 2006a) zeigte die Auswertung der Summenscores in der frühen und

späten Adoleszenz einen Effekt des *Grial*-Genotyps unabhängig vom Geschlecht der Tiere. Die Analyse der einzelnen Tage stellte dahingegen auch geschlechtsspezifische Effekte des *Grial*-Genotyps dar: so konnte ein genotypbedingter Unterschied an einem Tag jeweils in der frühen und späten Adoleszenz nur bei weiblichen Tieren nachgewiesen werden. Eine reduzierte Nestbauaktivität wurde bereits bei erwachsenen Tieren eines subchronischen phencyclidinbasierten Mausmodells für Schizophrenie festgestellt (PEDERSEN et al., 2014). In diesem Zusammenhang wurde das Nestbauverhalten insbesondere für den Nachweis von Verhaltensveränderungen bei den Tieren validiert, die mit den Negativsymptomen der Schizophrenie assoziiert werden können (PEDERSEN et al., 2014). Normales Nestbauverhalten setzt die Integrität des Hippocampus voraus (DEACON et al., 2002; KRAEUTER et al., 2019). Eine verminderte Adaptationsfähigkeit bei *Grial*^{-/-} Mäusen kann aufgrund erhöhter Aktivität des Hippocampus (Bannerman et al., 2014) und Veränderungen des Kurzzeitgedächtnisses (Taylor et al., 2011; Barkus et al., 2014; Aitta-Aho et al., 2019) zu Beeinträchtigungen der Wühl- und Nestbauaktivität führen. Das Protokoll zur Evaluation des Nestbauverhaltens von Kraeuter und Kollegen (2019) wurde im Besonderen für den Nachweis sensomotorischer Gating-Defizite in Mausmodellen neuropsychiatrischer Erkrankungen validiert. Auch eine erhöhte Reaktivität auf neue Stimuli (hier: Nestbaumaterial, Flasche mit Wühlsubstrat) kann zu einer Beeinträchtigung von koordinierten Verhaltensweisen wie der Wühl- und Nestbauaktivität der *Grial*^{-/-} Mäuse führen (Sanderson et al., 2008; Aitta-Aho et al., 2019). Verhaltensbeeinträchtigungen konnten bei *Grial*^{-/-} Mäusen bislang nur bei adulten oder spät-adoleszenten Tieren nachgewiesen werden [vgl. (INTA et al., 2014; VOGT et al., 2014)]. Daher ist es besonders interessant, dass im Rahmen dieser Dissertationsarbeit ein mit den negativen Symptomen der Schizophrenie assoziierbarer Phänotyp (hier: beeinträchtigt Nestbauverhalten) bei *GluA1*-defizienten Mäusen im präpubertären Alter nachgewiesen werden konnte.

Die Analyse der Laufradaktivität ermöglicht die Auswertung eines Verhaltens, für das die Tiere eine hohe intrinsische Motivation zeigen (MEIJER & ROBBERS, 2014). Ein Einfluss der *GluA1*-Defizienz auf die Laufradaktivität wurde bereits bei adulten Mäusen untersucht (MAKSIMOVIC et al., 2014; ANG et al., 2021): während Maksimovic und Kollegen (2014) keine Veränderungen der Laufradaktivität bei *Grial*^{-/-} Mäusen festgestellt haben, demonstrierten Ang und

Kollegen (2021) eine geringe Reduktion der Gesamtlaufradaktivität und im Besonderen eine deutliche Reduktion der Laufradaktivität von *Grial*^{-/-} Mäusen während der Dunkelphase. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der C67BL/6J Wildtyp-Mäuse im Rahmen des ersten Teilprojekts legten *Grial*^{-/-} Mäuse – unabhängig vom *Grial*-Genotyp – mit Erreichen der sexuellen Reife eine größere Distanz zurück als männliche Tiere, was für adulte Mäuse vorbeschrieben ist (SWALLOW et al., 1998; BOWEN et al., 2012).

Die im Heimkäfig der Tiere erhobenen Aktivitätsdaten – die innerhalb des 60-minütigen Intervalls zurückgelegte Distanz und die Fortbewegungsgeschwindigkeit – deuten auf eine Hypolokomotion der *Grial*^{-/-} Tiere in der Spätadoleszenz hin und zeichnen ein uneindeutiges Bild für die Erhebungen in der frühen Adoleszenz. Die Daten sollten vor dem Hintergrund der Kürze des Untersuchungsintervalls interpretiert werden. Die erniedrigten zonenspezifischen Aktivitäten präpubertärer *Grial*^{-/-} Tiere und sexuell reifer *Grial*^{-/-} Tiere beider Geschlechter können auf eine Verschiebung von Hauptaktivitätszeiten bei den *Grial*^{-/-} Tieren hinweisen und von einer Beeinträchtigung des zirkadianen Rhythmus der Tiere herrühren. Ang und Kollegen (2021) haben im Zusammenhang mit der verminderten Laufradaktivität der Tiere in der Dunkelphase bereits Daten publiziert, die auf zirkadiane Rhythmusstörungen im *Grial*-knockout-Mausmodell hinweisen. Daher wäre es in Zukunft von Interesse, trackingbasierte Daten zur Heimkäfigaktivität über längere Untersuchungsperioden bei jungen Mäusen mit GluA1-Defizienz zu generieren.

Die Aktivitätsdaten, die im Open-Field-Test erhoben wurden, zeigten in Bezug auf die zurückgelegte Gesamtdistanz – wie bereits mehrfach für adulte Mäuse mit GluA1-Defizienz vorbeschrieben (VEKOVISCHEVA et al., 2001; SCHMITT et al., 2003; WIEDHOLZ et al., 2008) – eine Hyperlokomotion (horizontale Aktivität) der *Grial*^{-/-} Tiere in der späten und auch bereits in der frühen Adoleszenz. Bei Betrachtung des Parameters *Rearing* konnte eine Frequenzerhöhung bei *Grial*^{-/-} Tieren erst für die späte Adoleszenz bestätigt werden. Zu beachten ist, dass der Parameter *Rearing* im *Grial*-Modell – im Gegensatz zum *Scn1a*-A1783V-Modell – nicht mit anderen Lokomotionsdaten aus dem Open-Field-Test positiv korreliert war und deshalb auch nicht notwendiger Weise einen Hinweis auf den Aktivitätsstatus der Tiere im Sinne der vertikalen Aktivität liefern muss. Bei der Betrachtung des Explorationsverhaltens der Tiere konnten Gruppenunterschiede

nur bei präpubertären Tieren festgestellt werden: ein erhöhtes Niveau thigmotaktischen Verhaltens konnte bei weiblichen *Grial*^{-/-} Tieren gezeigt werden.

Die Untersuchungen im Rahmen des Irwin-Tests konnten keine relevante Erhöhung der Summenscores bei *Grial*^{-/-} Mäusen darstellen. Gemeinsam mit den Ergebnissen der Hauptkomponentenanalyse spricht dies dafür, dass die klassische klinische Untersuchung von jungen *Grial*^{-/-} Mäusen keine Hinweise auf einen belastenden Phänotyp der Tiere liefern kann.

Die Bestimmung der adrenokortikalen Aktivität, die Hinweise auf den vier bis sechs Stunden vor Probenentnahme erfahrenen Disstress der Tiere geben kann (TOUMA et al., 2003), konnte eine *Grial*-assoziierte Erhöhung der Kortikosteronmetabolitkonzentrationen in der frühen und späten Adoleszenz nachweisen. Bei präpubertären Tieren wiesen nur die Proben weiblicher *Grial*^{-/-} Tiere eine höhere FCM-Konzentration auf als die weiblicher Wildtyp-Wurfgeschwister. Dies kann einen Hinweis auf ein erhöhtes Disstress-Niveau (KOLBE et al., 2015) sowie auf veränderte metabolische Bedürfnisse im Zusammenhang mit der körperlichen Entwicklungsverzögerung (KOOLHAAS et al., 2011) darstellen. Als klarer Hinweis einer körperlichen Entwicklungsverzögerung können die Körpergewichtsdaten, die unabhängig vom Geschlecht der Tiere eine Reduktion des Körpergewichts bei *Grial*^{-/-} Tieren aufzeigten, gewertet werden. Ferner können Veränderungen im neuronalen Netzwerk und Neurotransmitterimbilanzen zu einem verringerten Appetit der Tiere geführt haben.

Die Untersuchungen an den heranwachsenden Mäusen des *Grial*-Modells zeigten, dass die Tiere transiente Verhaltensveränderungen im Laufe der Entwicklung aufwiesen, die relevant für die Belastungseinschätzung sind. Die Reduktion des Wühlverhaltens in der späten Adoleszenz sowie die transiente Beeinträchtigung des Nestbauverhaltens in der frühen und späten Adoleszenz sprechen dafür, dass bei *GluA1*-defizienten Mäusen bereits in der Adoleszenz milde Verhaltensbeeinträchtigungen bestehen. Eine generelle Hyperlokomotion in dem Modell konnte vor allem im Hinblick auf die unveränderte Laufradaktivität der Tiere nicht bestätigt werden. Die negative Korrelation der Lokomotion im Open-Field-Test mit der Nestbauaktivität kann auf eine stimuliinduzierte Hyperaktivität und Beeinträchtigungen bei Informationsverarbeitungsprozessen hindeuten.

Transiente, geschlechtsspezifisch ausgeprägte Thigmotaxis kann auf erhöhtes angstassoziiertes Verhalten und Veränderungen des normalen explorativen Verhaltens hindeuten. Den einzigen Beweis eines klinisch nachweisbar nachteiligen Phänotyps stellt das reduzierte Körpergewicht im Laufe der Entwicklung der Tiere dar. Die Ergebnisse sprechen daher für eine laborspezifische Einstufung der Linie B6N.129-*Grial^{tm1Rsp}/J* in den Schweregrad „gering“.

4. Limitationen, Schlussfolgerungen und Ausblick

Das Studiendesign aller drei Teilprojekte umfasste im Rahmen der Durchführung der Verhaltensuntersuchungen die frequente Präsentation verschiedener neuer Objekte im Heimkäfig sowie die parallele Untersuchung verschiedener Verhaltensparameter. Dadurch können zum einen wertvolle spontane Verhaltensweisen von rein stimuliinduzierten Verhaltensweisen maskiert werden. Zum anderen stellt die parallele Testsituation einen wesentlichen Einfluss dar im Hinblick darauf, dass die Ergebnisse des einen Parameters vom gleichzeitig getesteten anderen Parameter fundamental beeinflusst sein können. Eine besondere Limitation im Hinblick auf die parallele Testsituation stellen FCM- und Laufradaktivitätsanalyse dar, da sich die Laufradaktivität stark auf die adrenokortikale Aktivität der Tiere auswirken kann (DROSTE et al., 2003). Wie bereits dargestellt, sollte die parallele Testsituation bei der Analyse von Laufradaktivität und Süßpräferenz besonders beachtet werden [bspw. (OTSUKA et al., 2015; PAGLIUSI et al., 2020)]. Des Weiteren entsteht durch das wiederholte Testen bei der für die beiden genetischen Modelle eingesetzten Testbatterie ein Trainings-, Lern- bzw. Gewöhnungseffekt der Tiere, der für alle Folgeuntersuchungen zu berücksichtigen ist. Hinsichtlich der Daten, die im Heimkäfig der Tiere ausgewertet wurden, ist zu beachten, dass diese nicht für das Einzeltier, sondern für die experimentelle Einheit von je zwei Tieren erhoben werden konnten. Im Hinblick auf stark individuell ausgeprägte Unterschiede beim Eintritt in verschiedene Entwicklungsphasen (BRUST et al., 2015) sowie aufgrund des Ranggefüges der Tiere geht dies mit einer deutlichen Erhöhung der Varianz im Besonderen bei jungen Tieren einher. Für die Verhaltensuntersuchungen bei den genetisch veränderten Modellen konnten zuchtbedingt nicht alle experimentellen Einheiten aus Wurfgeschwistern gebildet werden, was sich zusätzlich negativ auf die angenommene „phänotypische Uniformität“ der experimentellen Einheit ($n = 2$) auswirkte.

Eine besondere Limitation bei der Bewertung der Basisdaten, die bei Wildtyp-Mäusen mit dem Hintergrund C57BL/6JRj erhoben wurden, stellt die Stamm- und Substammspezifität verschiedener Verhaltensweisen beim Nager dar (MATSUO et al., 2010; ELTOKHI et al., 2020). So muss die bei C57BL/6JRj Mäusen mit dem Erreichen der sexuellen Reife einsetzende Wühlaktivität nicht mit der Altersphase verbunden sein, sondern kann auch auf die stammspezifische physische

Entwicklung der Tiere und das Körpergewicht zurückzuführen sein, das sich zwischen den verschiedenen Mausstämmen erheblich unterscheiden kann.

Hinsichtlich des Laufradverhaltens als Parameter zur Belastungseinschätzung sollte nicht unerwähnt bleiben, dass die Tatsache, dass Mäuse auch in der freien Wildbahn bei Angebot eines Laufrads Laufradaktivität zeigen (MEIJER & ROBBERS, 2014), nicht den Umkehrschluss zulässt, dass das Laufradverhalten einer Labormaus niemals stereotyp sein kann (MASON & WÜRBEL, 2016). Zudem gibt es Hinweise, dass der Verhaltensphänotyp und der Metabolismus genetisch veränderter Mäuse von der Laufradaktivität besonders stark beeinflusst werden können (BARAN et al., 2022). Diese Limitationen sollten besonders bei der Planung pharmakologischer Wirkstoffstudien berücksichtigt werden.

Eine weitere Limitation stellt die Praktikabilität digitaler heimkäfigbasierter Untersuchungen dar, die zum einen vom technologischen Fortschritt der verfügbaren Heimkäfigsysteme und zum anderen von der Kostenintensität der Heimkäfigeinheiten abhängt. Zum Zweck der Belastungseinschätzung genetisch veränderter Mauslinien ist eine grundsätzliche Einzelhaltung der Mäuse ethisch und rechtlich nicht zu rechtfertigen. Daher ist die Entwicklung von Heimkäfigsystemen, die eine störungsfreie Identifikation des Einzeltiers und ein individuelles *Tracking* aller Tiere einer Gruppe ermöglichen, besonders wichtig für Untersuchungen zur Belastungseinschätzung.

Hinsichtlich der generellen Eignung der Testbatterie zur Belastungseinschätzung sollte beachtet werden, dass von der Belastung der Linie nicht auf die tatsächliche Belastung des Einzeltiers geschlossen werden kann. Insofern stellt die im Rahmen dieses Dissertationsprojekts validierte Verhaltenstestbatterie kein Verfahren dar, mit dem die individuelle, tatsächliche Belastung einer jungen Maus beurteilt werden kann.

Die Verhaltenstestbatterie hat sich unter Berücksichtigung der vorgenannten Limitationen als geeignet erwiesen, um den Schweregrad der Belastung junger Mäuse zu bewerten und eine laborspezifische Empfehlung für die kumulative Belastung genetisch veränderter Mauslinien abgeben zu können. Der im Rahmen dieser Untersuchungen vergebene Schweregrad „mittel“ für die laborspezifische Belastung der Linie B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf}/J x 129S1/Sv-Hprt^{tm1(cre)Mnn}/J unterschied sich nicht von der Einschätzung der Linie gemäß Leitlinien des Bf3R (2016). Dahingegen wurde für die Linie B6N.129-*Gria1*^{tm1Rsp}/J, die gemäß vorgenannter Leitlinien als „nicht belastet“ eingestuft wurde, eine „geringe“ laborspezifische Belastung festgestellt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verhaltenstestbatterie auch dann für den Einsatz bei genetisch veränderten Mauslinien mit neurologischer bzw. neuropsychiatrischer Relevanz eine hinreichende Sensitivität hat, wenn keine oder eine geringe Belastung der Linie erwartet wird. Bei der Abgabe einer Empfehlung zur Belastung einer Linie sollte stets darauf hingewiesen werden, dass die Untersuchungen von laborspezifischen Faktoren und deren Standardisierung (bspw. Umweltbedingungen, Arbeitsroutine in der Tierhaltung, *Handling* der Tiere) beeinflusst werden.

Die Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer Einbeziehung der Entwicklungsphase für die kumulative Belastungseinschätzung genetisch veränderter Mauslinien. Zudem verdeutlichen die detektierten geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen den Genotypen die Notwendigkeit der Inklusion beider Geschlechter. Dies gilt sowohl für die evidenzbasierte Belastungseinschätzung als auch als Basis für die phänotypische Charakterisierung genetisch veränderter Mausmodelle in den Neurowissenschaften.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz genetisch veränderter Mauslinien spielt in der biomedizinischen Forschung eine immer größer werdende Rolle. Besonders in der neurowissenschaftlichen Forschung werden genetisch veränderte Mauslinien eingesetzt, bei denen pathologische Veränderungen und Verhaltensbeeinträchtigungen bereits im jungen Alter bei den Tieren auftreten können. Die Erfassung der bei den genetisch veränderten Mäusen im Laufe ihrer Individualentwicklung auftretenden Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhaften Schäden im Sinne der Richtlinie 2010/63/EU stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um die kumulative Belastung der Tiere zu beurteilen und Empfehlungen zur evidenzbasierten Belastungseinschätzung der genetisch veränderten Mauslinie abgeben zu können. Darüber hinaus ermöglicht die phänotypische Charakterisierung genetisch veränderter junger Tiere die Prüfung der Augenscheinvalidität sowie die Verbesserung der prädiktiven Validität des Tiermodells, insbesondere im Hinblick auf die Erforschung von Möglichkeiten frühzeitiger pharmakologischer Intervention. Im Rahmen dieses Dissertationsprojekts sollte daher eine Verhaltenstestbatterie zur evidenzbasierten Belastungseinschätzung junger Mäuse validiert werden. Hierfür durchliefen Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6JRj im präpubertären, pubertären, sexuell reifen, jung adulten sowie reif adulten Alter verschiedene Verhaltenstests, die zur Belastungseinschätzung adulter Mausmodelle bereits validiert wurden. Dabei wurden zahlreiche alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt, wobei sich der Großteil der Kandidatenparameter als geeignet für den Einsatz bei jungen Mäusen verschiedener Altersstufen erwies.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde eine modifizierte Verhaltenstestbatterie entwickelt und anschließend in zwei genetischen *loss-of-function* Modellen mit neurologischer bzw. neuropsychiatrischer Relevanz validiert. Bei den eingesetzten Mausmodellen handelte es sich zum einen um Mäuse, die eine heterozygote Missense-Mutation des *Scn1a*-Gens exprimierten und einen genetischen Modellorganismus für das Dravet-Syndrom darstellen – eine seltene, pädiatrische, therapierrefraktäre, epileptische Enzephalopathie. Zum anderen wurden Mäuse eines *Grial-knockout*-Modells eingesetzt. *Grial* konnte in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) als Kandidatengen der Schizophrenie

identifiziert werden. Beide Mausmodelle durchliefen die modifizierte Verhaltenstestbatterie im Laufe ihrer Entwicklung mit einem Fokus auf die Phase der Adoleszenz. Anhand der Untersuchungen konnten Verhaltensveränderungen bei den jungen Tieren festgestellt werden, die vom Alter, Genotyp sowie Geschlecht der Tiere beeinflusst wurden. Modell- und altersspezifische Analysen der Hauptkomponenten der Datensätze ergaben, dass sich die Gruppen vor allem anhand der lokomotorischen Parameter des Open-Field-Tests sowie anhand des Nestbauverhaltens, des Wühlverhaltens und des Saccharinpräferenztests unterschieden. Zudem wurden Parameter des Open-Field-Tests, die das explorative Verhalten beschreiben können, bei beiden genetischen Modellen zum Zeitpunkt der frühen Adoleszenz als besonders relevant identifiziert.

Anhand der Untersuchungsergebnisse konnten laborspezifische Empfehlungen für die kumulative Belastung der genetisch veränderten Mauslinien gegeben werden. Hinsichtlich der Linie B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf}/J x 129S1/Sv-Hprt^{tm1(cre)Mnn}/J sprechen die Ergebnisse gegen eine länger anhaltende Belastung der jungen Tiere. Anhand der Ergebnisse konnte eine laborspezifische Empfehlung zur Einstufung dieser Linie in den Schweregrad „mittel“ abgegeben werden. Hinsichtlich Linie B6N.129-*Grial*^{tm1Rsp}/J, die gemäß den Leitlinien des Bf3R als „nicht belastet“ eingestuft ist, deuten die Ergebnisse auf eine transiente, geringe Beeinträchtigung relevanter Verhaltensweisen bei den jungen Tieren hin. Anhand dieser Ergebnisse konnte für diese Linie eine „geringe“ laborspezifische Belastung festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit der Charakterisierung junger Mäuse für die kumulative Belastungseinschätzung genetisch veränderter Mauslinien – auch unter Einbeziehung der frühen postnatalen Phase. Zudem verdeutlichen die geschlechtsspezifischen Unterschiede die Relevanz der Inklusion beider Geschlechter für die phänotypische Charakterisierung genetisch veränderter Mausmodelle in den Neurowissenschaften.

VII. SUMMARY

Validation of a home-cage based behavioral test battery for evidence-based severity assessment in young mice

The use of genetically modified mouse lines is playing an increasingly important role in biomedical research. Particularly in neuroscience, genetically modified mouse lines are used in which pathological changes and behavioral impairments can already occur in animals at a young age. Appropriate assessment of the cumulative burden of laboratory animals in terms of “pain, suffering, distress or lasting harm”, as defined by Directive 2010/63/EU, is an important prerequisite to make recommendations for evidence-based severity assessment of genetically modified mouse lines. In addition, phenotypic characterization of genetic mouse models during development will allow testing of face validity as well as improving their predictive validity, especially with regard to exploring opportunities for early pharmacological intervention. This dissertation project therefore aims to validate a behavioral test battery for evidence-based severity assessment in young mice. For this purpose, wild-type mice of the strain C57BL/6JRj at prepubescent, pubescent, sexually mature, young adult, and mature adult ages underwent various behavioral tests which had already been validated for severity assessment in adult mice. Numerous age- and sex-specific differences were found, and the majority of candidate parameters proved suitable for application in young mice of different ages.

Based on these results, a modified behavioral test battery was designed and subsequently validated in two genetic *loss-of-function* models with neurological and neuropsychiatric relevance for Dravet syndrome and schizophrenia, respectively. The mouse models used were, firstly, mice expressing a heterozygous missense mutation in the *Scn1a* gene, representing a genetic model organism for Dravet syndrome – a rare, pediatric, therapy refractory, epileptic encephalopathy. Secondly, mice from a *Grial* knockout model were used. *Grial* has been identified as a candidate gene for schizophrenia in genome-wide association studies (GWAS). Both mouse models underwent a modified behavioral test battery during their development with a focus on the age bracket of adolescence. Based on these tests, behavioral changes in young mice were found to be influenced by age, genotype,

and sex of the animals. Model- and age-specific analyses of principle components of the data sets indicated that groups differed mainly based upon locomotor parameters of the open-field test as well as on the basis of nesting behavior, burrowing behavior, and the saccharine preference test. In addition, parameters of the open-field test that may describe exploratory behavior were identified as particularly relevant during early adolescence in both genetic models.

Based on these behavioral readouts, laboratory-specific recommendations for the assignment to severity levels were made: for the line B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf}/J x 129S1/Sv-Hprt^{tm1(cre)Mnn}/J, the findings argue against a persistent level of distress, and rather suggest that the model experiences a moderate overall burden. For the line B6N.129-*Gria1*^{tm1Rsp}/J, which is classified as a genetic model experiencing “no harm burden” in accordance with the Bf3R guidelines, the laboratory-specific readouts indicated transient, mild impairments of behavioral patterns relevant to animal welfare, and suggest a mild overall burden of the line. These results demonstrate the need for phenotypic characterization of young mice – including the early postnatal period – for cumulative severity assessment of genetically modified mouse lines. In addition, sex differences emphasize the relevance of including both sexes for phenotypic characterization of genetic mouse models in neuroscience research.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdelrahman A, Kumstel S, Zhang X, Liebig M, Wendt EHU, Eichberg J, Palme R, Thum T, Vollmar B, Zechner D. A novel multi-parametric analysis of non-invasive methods to assess animal distress during chronic pancreatitis. *Sci Rep* 2019; 9: 14084.
- Agoglia AE, Holstein SE, Eastman VR, Hodge CW. Cannabinoid CB1 receptor inhibition blunts adolescent-typical increased binge alcohol and sucrose consumption in male C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2016; 143: 11-7.
- Akiyama M, Kobayashi K, Ohtsuka Y. Dravet syndrome: a genetic epileptic disorder. *Acta Med Okayama* 2012; 66: 369-76.
- Ambrée O, Touma C, Görtz N, Keyvani K, Paulus W, Palme R, Sachser N. Activity changes and marked stereotypic behavior precede Abeta pathology in TgCRND8 Alzheimer mice. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 955-64.
- Andrásfalvy BK, Smith MA, Borchardt T, Sprengel R, Magee JC. Impaired regulation of synaptic strength in hippocampal neurons from GluR1-deficient mice. *J Physiol* 2003; 552: 35-45.
- Andrews N, Legg E, Lisak D, Issop Y, Richardson D, Harper S, Pheby T, Huang W, Burgess G, Machin I, Rice AS. Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur J Pain* 2012; 16: 485-95.
- Ang G, Brown LA, Tam SKE, Davies KE, Foster RG, Harrison PJ, Sprengel R, Vyazovskiy VV, Oliver PL, Bannerman DM, Peirson SN. Deletion of AMPA receptor GluA1 subunit gene (*Gria1*) causes circadian rhythm disruption and aberrant responses to environmental cues. *Transl Psychiatry* 2021; 11: 588.
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973; 21: 205-35.
- Aubert A. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23: 1029-36.
- Austen JM, Sprengel R, Sanderson DJ. GluA1 AMPAR subunit deletion reduces the hedonic response to sucrose but leaves satiety and conditioned responses intact. *Sci Rep* 2017; 7: 7424.
- Bahceci D, Anderson LL, Ocelli Hanbury Brown CV, Zhou C, Arnold JC. Adolescent behavioral abnormalities in a *Scn1a*(+/-) mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsy Behav* 2020; 103: 106842.
- Bailoo JD, Murphy E, Varholick JA, Novak J, Palme R, Würbel H. Evaluation of the effects

- of space allowance on measures of animal welfare in laboratory mice. *Sci Rep* 2018; 8: 713.
- Bailoo JD, Voelkl B, Varholick J, Novak J, Murphy E, Rosso M, Palme R, Würbel H. Effects of weaning age and housing conditions on phenotypic differences in mice. *Sci Rep* 2020; 10: 11684.
- Bale TL, Epperson CN. Sex differences and stress across the lifespan. *Nat Neurosci* 2015; 18: 1413-20.
- Bannerman DM, Deacon RM, Brady S, Bruce A, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN. A comparison of GluR-A-deficient and wild-type mice on a test battery assessing sensorimotor, affective, and cognitive behaviors. *Behav Neurosci* 2004; 118: 643-7.
- Bao AM, Swaab DF. Sex differences in the brain, behavior, and neuropsychiatric disorders. *Neuroscientist* 2010; 16: 550-65.
- Baran SW, Bratcher N, Dennis J, Gaburro S, Karlsson EM, Maguire S, Makidon P, Noldus LPJJ, Potier Y, Rosati G, Ruiter M, Schaevitz L, Sweeney P, LaFollette MR. Emerging Role of Translational Digital Biomarkers Within Home Cage Monitoring Technologies in Preclinical Drug Discovery and Development. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2022; 15.
- Barkus C, Feyder M, Graybeal C, Wright T, Wiedholz L, Izquierdo A, Kiselycznyk C, Schmitt W, Sanderson DJ, Rawlins JN, Saksida LM, Bussey TJ, Sprengel R, Bannerman D, Holmes A. Do GluA1 knockout mice exhibit behavioral abnormalities relevant to the negative or cognitive symptoms of schizophrenia and schizoaffective disorder? *Neuropharmacology* 2012; 62: 1263-72.
- Barkus C, Sanderson DJ, Rawlins JN, Walton ME, Harrison PJ, Bannerman DM. What causes aberrant salience in schizophrenia? A role for impaired short-term habituation and the GRIA1 (GluA1) AMPA receptor subunit. *Mol Psychiatry* 2014; 19: 1060-70.
- Bartling B, Al-Robaiy S, Lehnich H, Binder L, Hiebl B, Simm A. Sex-related differences in the wheel-running activity of mice decline with increasing age. *Exp Gerontol* 2017; 87: 139-47.
- Bateson P. When to experiment on animals. *New Scientist* 1986; 109: 30-2.
- Beauchamp TLCJF (1979) *Principles of biomedical ethics*. Oxford University Press, New York.
- Ben Abdallah NM, Fuss J, Trusel M, Galsworthy MJ, Bobsin K, Colacicco G, Deacon RM, Riva MA, Kellendonk C, Sprengel R, Lipp HP, Gass P. The puzzle box as a simple and efficient behavioral test for exploring impairments of general cognition and

- executive functions in mouse models of schizophrenia. *Exp Neurol* 2011; 227: 42-52.
- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990; 348: 448-50.
- Bf3R. Severity Assessment of genetically altered mice and rats, www.bfr.bund.de/cm/349/severity-assessment-of-genetically-altered-mice-and-rats-version-2.pdf (2016); 12.02.2022.
- Bf3R. https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2020-288932.html (2021); 12.02.2022.
- Bleich A, Tolba RH. How can we assess their suffering? German research consortium aims at defining a severity assessment framework for laboratory animals. *Lab Anim* 2017; 51: 667.
- Bleich A, Bankstahl M, Jirkof P, Prins JB, Tolba RH. Severity Assessment in animal based research. *Lab Anim* 2020; 54: 16.
- Boissy A, Manteuffel G, Jensen MB, Moe RO, Spruijt B, Keeling LJ, Winckler C, Forkman B, Dimitrov I, Langbein J, Bakken M, Veissier I, Aubert A. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiol Behav* 2007; 92: 375-97.
- Boldt L, Koska I, Maarten van Dijk R, Talbot SR, Miljanovic N, Palme R, Bleich A, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in mouse models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsy Behav* 2021; 115: 107689.
- Bowen RS, Knab AM, Hamilton AT, McCall JR, Moore-Harrison TL, Lightfoot JT. Effects of Supraphysiological Doses of Sex Steroids on Wheel Running Activity in Mice. *J Steroids Horm Sci* 2012; 3: 110.
- Bowen RS, Cates BE, Combs EB, Dillard BM, Epting JT, Foster BR, Patterson SV, Spivey TP. Stabilization of the wheel running phenotype in mice. *Physiol Behav* 2016; 155: 149-56.
- Bridges RS. The genetics of motherhood. *Nat Genet* 1998; 20: 108-9.
- Brill SA, Guerrero-Martin SM, Metcalf Pate KA. The Symbiotic Relationship Between Scientific Quality and Animal Research Ethics. *Ilar j* 2021; 60: 334-40.
- Brosnan JT, Brosnan ME. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids* 2013; 45: 413-8.

- Brunklaus A, Dorris L, Zuberi SM. Comorbidities and predictors of health-related quality of life in Dravet syndrome. *Epilepsia* 2011; 52: 1476-82.
- Brunklaus A, Ellis R, Reavey E, Forbes GH, Zuberi SM. Prognostic, clinical and demographic features in SCN1A mutation-positive Dravet syndrome. *Brain* 2012; 135: 2329-36.
- Brunklaus A, Zuberi SM. Dravet syndrome--from epileptic encephalopathy to channelopathy. *Epilepsia* 2014; 55: 979-84.
- Brust V, Schindler PM, Lewejohann L. Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Frontiers in Zoology* 2015; 12: S17.
- Buch T, Moos K, Ferreira FM, Fröhlich H, Gebhard C, Tresch A. Benefits of a factorial design focusing on inclusion of female and male animals in one experiment. *J Mol Med (Berl)* 2019; 97: 871-7.
- Buchecker V, Koska I, Pace C, Talbot SR, Palme R, Bleich A, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in mouse models with repeated seizures: (II.) Impact of surgery and intrahippocampal kainate. *Eur Surg Res* 2022.
- Buwalda B, Geerdink M, Vidal J, Koolhaas JM. Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35: 1713-21.
- Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res* 2002; 134: 49-57.
- Casey BJ, Heller AS, Gee DG, Cohen AO. Development of the emotional brain. *Neurosci Lett* 2019; 693: 29-34.
- Catterall WA, Kalume F, Oakley JC. NaV1.1 channels and epilepsy. *J Physiol* 2010; 588: 1849-59.
- Champagne FA, Curley JP. Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neurosci Biobehav Rev* 2009; 33: 593-600.
- Chater TE, Goda Y. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014; 8: 401-.
- Chourbaji S, Vogt MA, Fumagalli F, Sohr R, Frasca A, Brandwein C, Hörtnagl H, Riva MA, Sprengel R, Gass P. AMPA receptor subunit 1 (GluR-A) knockout mice model the glutamate hypothesis of depression. *Faseb j* 2008; 22: 3129-34.

- Contreras KM, Caillaud M, Neddenriep B, Bagdas D, Roberts JL, Ulker E, White AB, Aboulhosn R, Toma W, Khalefa T, Adel A, Mann JA, Damaj MI. Deficit in voluntary wheel running in chronic inflammatory and neuropathic pain models in mice: Impact of sex and genotype. *Behav Brain Res* 2021; 399: 113009.
- Corder KM, Li Q, Cortes MA, Bartley AF, Davis TR, Dobrunz LE. Overexpression of neuropeptide Y decreases responsiveness to neuropeptide Y. *Neuropeptides* 2020; 79: 101979.
- Crawley J. *What's Wrong With My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice: Second Edition.* 2006: 1-523.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 775-90.
- de la Puente B, Romero-Alejo E, Vela JM, Merlos M, Zamanillo D, Portillo-Salido E. Changes in saccharin preference behavior as a primary outcome to evaluate pain and analgesia in acetic acid-induced visceral pain in mice. *J Pain Res* 2015; 8: 663-73.
- Deacon RM, Croucher A, Rawlins JN. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav Brain Res* 2002; 132: 203-13.
- Deacon RM. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* 2006a; 1: 1117-9.
- Deacon RM. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc* 2006b; 1: 118-21.
- Deacon RM, Cholerton LL, Talbot K, Nair-Roberts RG, Sanderson DJ, Romberg C, Koros E, Bornemann KD, Rawlins JN. Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice. *Behav Brain Res* 2008; 189: 126-38.
- Deacon RM. Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behav Brain Res* 2009; 200: 128-33.
- Deacon RM. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp* 2012: e2607.
- DFG-FOR2591. The DFG research unit 2591 – a research consortium aims at defining a severity assessment framework for laboratory animals: <http://severity-assessment.de/>; 12.02.2022.
- Dravet C. *Les épilepsies graves de l'enfant.* 1978.
- Dravet C. Severe myoclonic epilepsy in infants and its related syndromes. *Epilepsia* 2000;

41 Suppl 9: 7.

Dravet C. The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia* 2011a; 52 Suppl 2: 3-9.

Dravet C. Dravet syndrome history. *Dev Med Child Neurol* 2011b; 53 Suppl 2: 1-6.

Dreshfield LJ, Berry SD. Age-dependent taste preferences in rabbits for a .025% sodium saccharin solution: preliminary findings. *Exp Aging Res* 1994; 20: 145-54.

Droste SK, Gesing A, Ulbricht S, Müller MB, Linthorst AC, Reul JM. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 2003; 144: 3012-23.

Dugger SA, Platt A, Goldstein DB. Drug development in the era of precision medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17: 183-96.

Durst M, Graf TR, Graf R, Kron M, Arras M, Zechner D, Palme R, Talbot SR, Jirkof P. Analysis of Pain and Analgesia Protocols in Acute Cerulein-Induced Pancreatitis in Male C57BL/6 Mice. *Front Physiol* 2021; 12: 744638.

Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* 2016; 152: 244-8.

Egerton A, Grace AA, Stone J, Bossong MG, Sand M, McGuire P. Glutamate in schizophrenia: Neurodevelopmental perspectives and drug development. *Schizophr Res* 2020; 223: 59-70.

Ehret G, Bernecker C. Low-frequency sound communication by mouse pups (*Mus musculus*): wriggling calls release maternal behaviour. *Animal Behaviour* 1986; 34: 821-30.

Eltokhi A, Kurpiers B, Pitzer C. Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects. *Sci Rep* 2020; 10: 11263.

Eltokhi A, Kurpiers B, Pitzer C. Baseline Depression-Like Behaviors in Wild-Type Adolescent Mice Are Strain and Age but Not Sex Dependent. *Front Behav Neurosci* 2021; 15: 759574.

Elwood RW, Keeling F. Temporal organization of ultrasonic vocalizations in infant mice. *Dev Psychobiol* 1982; 15: 221-7.

Engin A. Circadian Rhythms in Diet-Induced Obesity. *Adv Exp Med Biol* 2017; 960: 19-52.

EU. BERICHT DER KOMMISSION AN DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND

DEN RAT. Bericht 2019 über die statistischen Daten über die Verwendung von Tieren für wissenschaftliche Zwecke in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union in den Jahren 2015-2017. (2020); 12.02.2022.

Falkai P, Hasan A (2019) Praxishandbuch Schizophrenie: Diagnostik – Therapie – Versorgungsstrukturen. Elsevier Health Sciences.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46: 470-2.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr., Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55: 475-82.

Fitzgerald PJ, Barkus C, Feyder M, Wiedholz LM, Chen YC, Karlsson RM, Machado-Vieira R, Graybeal C, Sharp T, Zarate C, Harvey-White J, Du J, Sprengel R, Gass P, Bannerman D, Holmes A. Does gene deletion of AMPA GluA1 phenocopy features of schizoaffective disorder? *Neurobiol Dis* 2010; 40: 608-21.

Flecknell PA. Refinement of animal use--assessment and alleviation of pain and distress. *Lab Anim* 1994; 28: 222-31.

Gaskill BN, Gordon CJ, Pajor EA, Lucas JR, Davis JK, Garner JP. Heat or insulation: behavioral titration of mouse preference for warmth or access to a nest. *PLoS One* 2012; 7: e32799.

Genton P, Velizarova R, Dravet C. Dravet syndrome: The long-term outcome. *Epilepsia* 2011; 52: 44-9.

Gerecsei LI, Csillag A, Zachar G, Gévai L, Simon L, Dobolyi Á, Ádám Á. Gestational Exposure to the Synthetic Cathinone Methylenedioxypropylvalerone Results in Reduced Maternal Care and Behavioral Alterations in Mouse Pups. *Front Neurosci* 2018; 12: 27.

Gold DA. An examination of instrumental activities of daily living assessment in older adults and mild cognitive impairment. *J Clin Exp Neuropsychol* 2012; 34: 11-34.

Gordon EA, Corbitt C. Investigation of pre-pubertal sex differences in wheel running and social behavior in three mouse strains. *J Ethol* 2015; 33: 177-87.

Gross D, Tolba RH. Ethics in Animal-Based Research. *Eur Surg Res* 2015; 55: 43-57.

Häger C, Keubler LM, Talbot SR, Biernot S, Weegh N, Buchheister S, Buettner M, Glage

- S, Bleich A. Running in the wheel: Defining individual severity levels in mice. *PLoS Biol* 2018; 16: e2006159.
- Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative psychology* 1934; 18: 385.
- Hart AD, Wyttenbach A, Perry VH, Teeling JL. Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences. *Brain Behav Immun* 2012; 26: 754-65.
- Hattori J, Ouchida M, Ono J, Miyake S, Maniwa S, Mimaki N, Ohtsuka Y, Ohmori I. A screening test for the prediction of Dravet syndrome before one year of age. *Epilepsia* 2008; 49: 626-33.
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 2000; 287: 2262-7.
- Hefner K, Holmes A. Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 2007; 176: 210-5.
- Higurashi N, Broccoli V, Hirose S. Genetics and gene therapy in Dravet syndrome. *Epilepsy Behav* 2021: 108043.
- Howes O, McCutcheon R, Stone J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *J Psychopharmacol* 2015; 29: 97-115.
- Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 2013; 80: 704-17.
- Inta D, Vogt MA, Elkin H, Weber T, Lima-Ojeda JM, Schneider M, Luoni A, Riva MA, Gertz K, Hellmann-Regen J, Kronenberg G, Meyer-Lindenberg A, Sprengel R, Gass P. Phenotype of mice with inducible ablation of GluA1 AMPA receptors during late adolescence: relevance for mental disorders. *Hippocampus* 2014; 24: 424-35.
- Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 1968; 13: 222-57.
- Ishii A, Watkins JC, Chen D, Hirose S, Hammer MF. Clinical implications of SCN1A missense and truncation variants in a large Japanese cohort with Dravet syndrome. *Epilepsia* 2017; 58: 282-90.
- Jensen V, Kaiser KM, Borchardt T, Adelman G, Rozov A, Burnashev N, Brix C, Frotscher

- M, Andersen P, Hvalby Ø, Sakmann B, Seeburg PH, Sprengel R. A juvenile form of postsynaptic hippocampal long-term potentiation in mice deficient for the AMPA receptor subunit GluR-A. *J Physiol* 2003; 553: 843-56.
- Jirkof P, Leucht K, Cesarovic N, Caj M, Nicholls F, Rogler G, Arras M, Hausmann M. Burrowing is a sensitive behavioural assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice. *Lab Anim* 2013a; 47: 274-83.
- Jirkof P, Fleischmann T, Cesarovic N, Rettich A, Vogel J, Arras M. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab Anim* 2013b; 47: 153-61.
- Jirkof P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods* 2014; 234: 139-46.
- Kaczurkin AN, Raznahan A, Satterthwaite TD. Sex differences in the developing brain: insights from multimodal neuroimaging. *Neuropsychopharmacology* 2019; 44: 71-85.
- Kallai J, Makany T, Csatho A, Karadi K, Horvath D, Kovacs-Labadi B, Jarai R, Nadel L, Jacobs JW. Cognitive and affective aspects of thigmotaxis strategy in humans. *Behav Neurosci* 2007; 121: 21-30.
- Kalume F. Sudden unexpected death in Dravet syndrome: respiratory and other physiological dysfunctions. *Respir Physiol Neurobiol* 2013; 189: 324-8.
- Kalume F, Westenbroek RE, Cheah CS, Yu FH, Oakley JC, Scheuer T, Catterall WA. Sudden unexpected death in a mouse model of Dravet syndrome. *J Clin Invest* 2013; 123: 1798-808.
- Kamens HM, Silva C, Peck C, Miller CN. Varenicline modulates ethanol and saccharin consumption in adolescent male and female C57BL/6J mice. *Brain Res Bull* 2018; 138: 20-5.
- Keubler LM, Hoppe N, Potschka H, Talbot SR, Vollmar B, Zechner D, Häger C, Bleich A. Where are we heading? Challenges in evidence-based severity assessment. *Lab Anim* 2020; 54: 50-62.
- Klein S, Bankstahl JP, Löscher W, Bankstahl M. Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2015; 263: 263-71.
- Koivisto H, Ytebrouck E, Carmans S, Naderi R, Miettinen PO, Roucourt B, Tanila H. Progressive age-dependent motor impairment in human tau P301S overexpressing mice. *Behav Brain Res* 2019; 376: 112158.

- Kolbe T, Palme R, Tichy A, Rüllicke T. Lifetime Dependent Variation of Stress Hormone Metabolites in Feces of Two Laboratory Mouse Strains. *PLoS One* 2015; 10: e0136112.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wöhr M, Fuchs E. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35: 1291-301.
- Kopec CD, Real E, Kessels HW, Malinow R. GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *J Neurosci* 2007; 27: 13706-18.
- Koska I, van Dijk RM, Seiffert I, Di Liberto V, Möller C, Palme R, Hellweg R, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: II. Chemical post-status epilepticus model. *Epilepsia* 2019; 60: 2114-27.
- Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Nest Building Test in Mice for Assessment of General Well-Being. *Methods Mol Biol* 2019; 1916: 87-91.
- Krueger J, Berg AT. Incidence of Dravet Syndrome in a US Population. *Pediatric neurology briefs* 2015; 29: 92-.
- Kuleshkaya N, Voikar V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: role of equipment and procedure. *Physiol Behav* 2014; 133: 30-8.
- Kuo FS, Cleary CM, LoTurco JJ, Chen X, Mulkey DK. Disordered breathing in a mouse model of Dravet syndrome. *Elife* 2019; 8.
- Lagae L, Brambilla I, Mingorance A, Gibson E, Battersby A. Quality of life and comorbidities associated with Dravet syndrome severity: a multinational cohort survey. *Dev Med Child Neurol* 2018; 60: 63-72.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL,

- Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowki J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J. Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 687-702.
- Layer N, Sonnenberg L, Pardo González E, Benda J, Hedrich UBS, Lerche H, Koch H, Wuttke TV. Dravet Variant SCN1AA1783V Impairs Interneuron Firing Predominantly by Altered Channel Activation. *Frontiers in cellular neuroscience* 2021; 15.
- Le Roy I, Carlier M, Roubertoux PL. Sensory and motor development in mice: genes, environment and their interactions. *Behav Brain Res* 2001; 125: 57-64.
- Lee HK, Takamiya K, He K, Song L, Huganir RL. Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. *J Neurophysiol* 2010; 103: 479-89.
- Leng Y, Musiek ES, Hu K, Cappuccio FP, Yaffe K. Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 2019; 18: 307-18.
- Leppänen PK, Ravaja N, Ewalds-Kvist SB. Twenty-three generations of mice bidirectionally selected for open-field thigmotaxis: selection response and repeated exposure to the open field. *Behav Processes* 2006; 72: 23-31.
- Löscher W, Brandt C, Ebert U. Excessive weight gain in rats over extended kindling of the basolateral amygdala. *Neuroreport* 2003; 14: 1829-32.

- Lossin C. A catalog of SCN1A variants. *Brain Dev* 2009; 31: 114-30.
- Lynch JJ, 3rd, Castagné V, Moser PC, Mittelstadt SW. Comparison of methods for the assessment of locomotor activity in rodent safety pharmacology studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2011; 64: 74-80.
- Maksimovic M, Vekovischeva OY, Aitta-aho T, Korpi ER. Chronic treatment with mood-stabilizers attenuates abnormal hyperlocomotion of GluA1-subunit deficient mice. *PLoS One* 2014; 9: e100188.
- Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2002; 25: 103-26.
- Mallien AS, Häger C, Palme R, Talbot SR, Vogt MA, Pfeiffer N, Brandwein C, Struve B, Inta D, Chourbaji S, Hellweg R, Vollmayr B, Bleich A, Gass P. Systematic analysis of severity in a widely used cognitive depression model for mice. *Lab Anim* 2020; 54: 40-9.
- Mandal J, Parija SC. Ethics of involving animals in research. *Trop Parasitol* 2013; 3: 4-6.
- Mason G, Würbel H. What can be learnt from wheel-running by wild mice, and how can we identify when wheel-running is pathological? *Proc Biol Sci* 2016; 283
- Mason GJ, Mendl MT. Why is there no simple way of measuring animal welfare. *Animal Welfare* 1993; 2: 301-19.
- Massey CA, Sowers LP, Dlouhy BJ, Richerson GB. Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 271-82.
- Matsuda KI, Mori H, Kawata M. Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Rev Endocr Metab Disord* 2012; 13: 163-71.
- Matsuo N, Takao K, Nakanishi K, Yamasaki N, Tanda K, Miyakawa T. Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Front Behav Neurosci* 2010; 4: 29.
- Max-Planck-Gesellschaft. White Paper - Stellungnahme der Max-Planck-Gesellschaft zu Tierversuchen in der Grundlagenforschung. (2016); 12.02.2022.
- McCarthy MM. Sex differences in the developing brain as a source of inherent risk. *Dialogues Clin Neurosci* 2016; 18: 361-72.
- McCutcheon RA, Reis Marques T, Howes OD. Schizophrenia-An Overview. *JAMA Psychiatry* 2020; 77: 201-10.
- McLinden KA, Kranjac D, Deodati LE, Kahn M, Chumley MJ, Boehm GW. Age

- exacerbates sickness behavior following exposure to a viral mimetic. *Physiol Behav* 2012; 105: 1219-25.
- Meek LR, Dittel PL, Sheehan MC, Chan JY, Kjolhaug SR. Effects of stress during pregnancy on maternal behavior in mice. *Physiol Behav* 2001; 72: 473-9.
- Meijer JH, Robbers Y. Wheel running in the wild. *Proc Biol Sci* 2014; 281
- Miljanovic N, van Dijk RM, Buchecker V, Potschka H. Metabolomic signature of the Dravet syndrome: A genetic mouse model study. *Epilepsia* 2021a;
- Miljanovic N, Hauck SM, van Dijk RM, Di Liberto V, Rezaei A, Potschka H. Proteomic signature of the Dravet syndrome in the genetic *Scn1a*-A1783V mouse model. *Neurobiol Dis* 2021b; 157: 105423.
- Miller AR, Hawkins NA, McCollom CE, Kearney JA. Mapping genetic modifiers of survival in a mouse model of Dravet syndrome. *Genes Brain Behav* 2014; 13: 163-72.
- Molenhuis RT, de Visser L, Bruining H, Kas MJ. Enhancing the value of psychiatric mouse models; differential expression of developmental behavioral and cognitive profiles in four inbred strains of mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014; 24: 945-54.
- Möller C, van Dijk RM, Wolf F, Keck M, Schönhoff K, Bierling V, Potschka H. Impact of repeated kindled seizures on heart rate rhythms, heart rate variability, and locomotor activity in rats. *Epilepsy Behav* 2019; 92: 36-44.
- Moore EM, Linsenhardt DN, Melon LC, Boehm SL, 2nd. Ontogenetic differences in adolescent and adult C57BL/6J and DBA/2J mice: anxiety-like, locomotor, and consummatory behaviors. *Dev Psychobiol* 2011; 53: 141-56.
- Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, Piven J, Crawley JN. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* 2004; 3: 287-302.
- Naneix F, Darlot F, De Smedt-Peyrusse V, Pape JR, Coutureau E, Cador M. Protracted motivational dopamine-related deficits following adolescence sugar overconsumption. *Neuropharmacology* 2018; 129: 16-25.
- Neely CLC, Pedemonte KA, Boggs KN, Flinn JM. Nest Building Behavior as an Early Indicator of Behavioral Deficits in Mice. *J Vis Exp* 2019.
- Nugent BM, Wright CL, Shetty AC, Hodes GE, Lenz KM, Mahurkar A, Russo SJ, Devine SE, McCarthy MM. Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat Neurosci* 2015; 18: 690-7.

- Oakley JC, Kalume F, Catterall WA. Insights into pathophysiology and therapy from a mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia* 2011; 52 Suppl 2: 59-61.
- Otsuka A, Shiuchi T, Chikahisa S, Shimizu N, Séi H. Voluntary exercise and increased food intake after mild chronic stress improve social avoidance behavior in mice. *Physiol Behav* 2015; 151: 264-71.
- Pagliusi M, Jr., Bonet IJM, Brandão AF, Magalhães SF, Tambeli CH, Parada CA, Sartori CR. Therapeutic and Preventive Effect of Voluntary Running Wheel Exercise on Social Defeat Stress (SDS)-induced Depressive-like Behavior and Chronic Pain in Mice. *Neuroscience* 2020; 428: 165-77.
- Palme R, Touma C, Lepschy M, Arias N, Dominchin F. Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. *Wiener tierärztliche Monatsschrift* 2013; 100: 238-46.
- Palme R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol Behav* 2019; 199: 229-43.
- Pattwell SS, Liston C, Jing D, Ninan I, Yang RR, Witztum J, Murdock MH, Dincheva I, Bath KG, Casey BJ, Deisseroth K, Lee FS. Dynamic changes in neural circuitry during adolescence are associated with persistent attenuation of fear memories. *Nat Commun* 2016; 7: 11475.
- Pedersen CS, Sørensen DB, Parachikova AI, Plath N. PCP-induced deficits in murine nest building activity: employment of an ethological rodent behavior to mimic negative-like symptoms of schizophrenia. *Behav Brain Res* 2014; 273: 63-72.
- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2020; 18: e3000410.
- Pernold K, Iannello F, Low BE, Rigamonti M, Rosati G, Scavizzi F, Wang J, Raspa M, Wiles MV, Ulfhake B. Towards large scale automated cage monitoring - Diurnal rhythm and impact of interventions on in-cage activity of C57BL/6J mice recorded 24/7 with a non-disrupting capacitive-based technique. *PLoS One* 2019; 14: e0211063.
- Pond HL, Heller AT, Gural BM, McKissick OP, Wilkinson MK, Manzini MC. Digging behavior discrimination test to probe burrowing and exploratory digging in male and female mice. *J Neurosci Res* 2021; 99: 2046-58.
- Porter RH. Communication in rodents: adults to infants. In: Elwood, R.W. (Ed.). *Parental Behaviour of Rodents*. John Wiley & Sons Ltd. 1983: 95–125.

Post AM, Weyers P, Holzer P, Painsipp E, Pauli P, Wultsch T, Reif A, Lesch KP. Gene-environment interaction influences anxiety-like behavior in ethologically based mouse models. *Behav Brain Res* 2011; 218: 99-105.

Psychembel Online. www.psychembel.de (2022). 15.09.2022.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Austria 2020.

Raineki C, Cortés MR, Belnoue L, Sullivan RM. Effects of early-life abuse differ across development: infant social behavior deficits are followed by adolescent depressive-like behaviors mediated by the amygdala. *J Neurosci* 2012; 32: 7758-65.

Reichelt AC, Abbott KN, Westbrook RF, Morris MJ. Differential motivational profiles following adolescent sucrose access in male and female rats. *Physiol Behav* 2016; 157: 13-9.

Reisel D, Bannerman DM, Schmitt WB, Deacon RM, Flint J, Borchardt T, Seeburg PH, Rawlins JN. Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat Neurosci* 2002; 5: 868-73.

Remschmidt H, Theisen F. Early-onset schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2012; 66: 63-9.

Ricobaraza A, Mora-Jimenez L, Puerta E, Sanchez-Carpintero R, Mingorance A, Artieda J, Nicolas MJ, Besne G, Bunuales M, Gonzalez-Aparicio M, Sola-Sevilla N, Valencia M, Hernandez-Alcoceba R. Epilepsy and neuropsychiatric comorbidities in mice carrying a recurrent Dravet syndrome SCN1A missense mutation. *Sci Rep* 2019; 9: 14172.

Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kähler AK, Akterin S, Bergen SE, Collins AL, Crowley JJ, Fromer M, Kim Y, Lee SH, Magnusson PK, Sanchez N, Stahl EA, Williams S, Wray NR, Xia K, Bettella F, Borglum AD, Bulik-Sullivan BK, Cormican P, Craddock N, de Leeuw C, Durmishi N, Gill M, Golimbet V, Hamshere ML, Holmans P, Hougaard DM, Kendler KS, Lin K, Morris DW, Mors O, Mortensen PB, Neale BM, O'Neill FA, Owen MJ, Milovancevic MP, Posthuma D, Powell J, Richards AL, Riley BP, Ruderfer D, Rujescu D, Sigurdsson E, Silagadze T, Smit AB, Stefansson H, Steinberg S, Suvisaari J, Tosato S, Verhage M, Walters JT, Levinson DF, Gejman PV, Kendler KS, Laurent C, Mowry BJ, O'Donovan MC, Owen MJ, Pulver AE, Riley BP, Schwab SG, Wildenauer DB, Dudbridge F, Holmans P, Shi J, Albus M, Alexander M, Campion D, Cohen D, Dikeos D, Duan J, Eichhammer P, Godard S, Hansen M, Lerer FB, Liang KY, Maier W, Mallet J, Nertney DA, Nestadt G, Norton N, O'Neill FA, Papadimitriou GN, Ribble R, Sanders AR, Silverman JM, Walsh D, Williams NM, Wormley B, Arranz MJ, Bakker S, Bender S, Bramon E, Collier D, Crespo-Facorro B, Hall J, Iyegbe C, Jablensky A, Kahn RS, Kalaydjieva L, Lawrie S, Lewis CM, Lin K, Linszen DH, Mata I, McIntosh A, Murray RM, Ophoff RA, Powell J, Rujescu D, Van Os J, Walshe M, Weisbrod M, Wiersma D, Donnelly P, Barroso I, Blackwell JM, Bramon E, Brown MA, Casas JP, Corvin AP, Deloukas P, Duncanson A,

- Jankowski J, Markus HS, Mathew CG, Palmer CN, Plomin R, Rautanen A, Sawcer SJ, Trembath RC, Viswanathan AC, Wood NW, Spencer CC, Band G, Bellenguez C, Freeman C, Hellenthal G, Giannoulatou E, Pirinen M, Pearson RD, Strange A, Su Z, Vukcevic D, Donnelly P, Langford C, Hunt SE, Edkins S, Gwilliam R, Blackburn H, Bumpstead SJ, Dronov S, Gillman M, Gray E, Hammond N, Jayakumar A, McCann OT, Liddle J, Potter SC, Ravindrarajah R, Ricketts M, Tashakkori-Ghanbaria A, Waller MJ, Weston P, Widaa S, Whittaker P, Barroso I, Deloukas P, Mathew CG, Blackwell JM, Brown MA, Corvin AP, McCarthy MI, Spencer CC, Bramon E, Corvin AP, O'Donovan MC, Stefansson K, Scolnick E, Purcell S, McCarroll SA, Sklar P, Hultman CM, Sullivan PF. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet* 2013; 45: 1150-9.
- Rodewald K. Kognitive Defizite bei schizophren Erkrankten: Vergleich der Wirksamkeit eines Trainings zum Problemlösen und einem Training basaler Kognition. Dissertationsschrift, Heidelberg 2010.
- Rujescu D. Genetics in schizophrenia. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie*, 2019; 20 (2), 76-79 2019.
- Rund BR. The research evidence for schizophrenia as a neurodevelopmental disorder. *Scand J Psychol* 2018; 59: 49-58.
- Russell W, Burch R. The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare 1959.
- Rutten K, Schiene K, Robens A, Leipelt A, Pasqualon T, Read SJ, Christoph T. Burrowing as a non-reflex behavioural readout for analgesic action in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation. *Eur J Pain* 2014; 18: 204-12.
- Rutter M, Caspi A, Moffitt TE. Using sex differences in psychopathology to study causal mechanisms: unifying issues and research strategies. *J Child Psychol Psychiatry* 2003; 44: 1092-115.
- Sahai N, Bard AM, Devinsky O, Kalume F. Disordered autonomic function during exposure to moderate heat or exercise in a mouse model of Dravet syndrome. *Neurobiol Dis* 2021; 147: 105154.
- Sanchez-Alavez M, Alboni S, Conti B. Sex- and age-specific differences in core body temperature of C57Bl/6 mice. *Age (Dordr)* 2011; 33: 89-99.
- Sanderson DJ, McHugh SB, Good MA, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM. Spatial working memory deficits in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice reflect impaired short-term habituation: evidence for Wagner's dual-process memory model. *Neuropsychologia* 2010; 48: 2303-15.
- Sartori CR, Pagliusi M, Jr., Bonet IJM, Tambeli CH, Parada CA. Running wheel exercise induces therapeutic and preventive effects on inflammatory stimulus-induced persistent hyperalgesia in mice. *PLoS One* 2020; 15: e0240115.

- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (SWGotPG). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 2014; 511: 421-7.
- Schmitt WB, Deacon RM, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM. A within-subjects, within-task demonstration of intact spatial reference memory and impaired spatial working memory in glutamate receptor-A-deficient mice. *J Neurosci* 2003; 23: 3953-9.
- Schwabe K, Boldt L, Bleich A, van Dijk RM, Helgers SOA, Häger C, Nowakowska M, Riedesel AK, Schönhoff K, Struve B, Wittek J, Potschka H. Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex. *Lab Anim* 2020; 54: 17-25.
- Scott AJ, Sharpe L, Loomes M, Gandy M. Systematic Review and Meta-Analysis of Anxiety and Depression in Youth With Epilepsy. *J Pediatr Psychol* 2020; 45: 133-44.
- Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 2015: e52434.
- Seiffert I, van Dijk RM, Koska I, Di Liberto V, Möller C, Palme R, Hellweg R, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: III. Electrical post-status epilepticus model. *Epilepsia* 2019; 60: 1539-51.
- Sensini F, Inta D, Palme R, Brandwein C, Pfeiffer N, Riva MA, Gass P, Mallien AS. The impact of handling technique and handling frequency on laboratory mouse welfare is sex-specific. *Sci Rep* 2020; 10: 17281.
- Sherwin CM, Haug E, Terkelsen N, Vadgama M. Studies on the motivation for burrowing by laboratory mice. *Applied Animal Behaviour Science* 2004; 88: 343-58.
- Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 2001; 105: 331-43.
- Smith D, Anderson D, Degryse AD, Bol C, Criado A, Ferrara A, Franco NH, Gyertyan I, Orellana JM, Ostergaard G, Varga O, Voipio HM. Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report. *Lab Anim* 2018; 52: 5-57.
- Snoeijsen-Schouwenaars FM, van Ool JS, Tan IY, Aldenkamp AP, Schelhaas HJ, Hendriksen JGM. Mood, anxiety, and perceived quality of life in adults with epilepsy and intellectual disability. *Acta Neurol Scand* 2019; 139: 519-25.
- Sprengel R, Suchanek B, Amico C, Brusa R, Burnashev N, Rozov A, Hvalby O, Jensen V, Paulsen O, Andersen P, Kim JJ, Thompson RF, Sun W, Webster LC, Grant SG,

- Eilers J, Konnerth A, Li J, McNamara JO, Seeburg PH. Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* 1998; 92: 279-89.
- Strickland JA, Austen JM, Sprengel R, Sanderson DJ. The GluA1 AMPAR subunit is necessary for hedonic responding but not hedonic value in female mice. *Physiol Behav* 2021; 228: 113206.
- Sturman O, Germain PL, Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress* 2018; 21: 443-52.
- Sukoff Rizzo SJ, Crawley JN. Behavioral Phenotyping Assays for Genetic Mouse Models of Neurodevelopmental, Neurodegenerative, and Psychiatric Disorders. *Annu Rev Anim Biosci* 2017; 5: 371-89.
- Swallow JG, Carter PA, Garland T, Jr. Artificial selection for increased wheel-running behavior in house mice. *Behav Genet* 1998; 28: 227-37.
- Szyf M, Weaver I, Meaney M. Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior. *Reprod Toxicol* 2007; 24: 9-19.
- Talbot SR, Biernot S, Bleich A, Van Dijk RM, Ernst L, Häger C, Helgers SOA, Koegel B, Koska I, Kuhla A, Miljanovic N, Müller-Graff FT, Schwabe K, Tolba R, Vollmar B, Weegh N, Wölk T, Wolf F, Wree A, Zieglowski L, Potschka H, Zechner D. Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. *Lab Anim* 2020; 54: 99-110.
- Tang G, Seume N, Häger C, Kumstel S, Abshagen K, Bleich A, Vollmar B, Talbot SR, Zhang X, Zechner D. Comparing distress of mouse models for liver damage. *Sci Rep* 2020; 10: 19814.
- Tang SH, Silva FJ, Tsark WM, Mann JR. A Cre/loxP-deleter transgenic line in mouse strain 129S1/SvImJ. *Genesis* 2002; 32: 199-202.
- Tappe-Theodor A, King T, Morgan MM. Pros and Cons of Clinically Relevant Methods to Assess Pain in Rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2019; 100: 335-43.
- Tecott LH, Nestler EJ. Neurobehavioral assessment in the information age. *Nat Neurosci* 2004; 7: 462-6.
- Thibaut F. The role of sex and gender in neuropsychiatric disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 2016; 18: 351-2.
- Torres-Lista V, Giménez-Llort L. Impairment of nesting behaviour in 3xTg-AD mice. *Behav Brain Res* 2013; 247: 153-7.

- Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 130: 267-78.
- Touma C, Palme R, Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav* 2004; 45: 10-22.
- Tro-Baumann B, von Spiczak S, Lotte J, Bast T, Haberlandt E, Sassen R, Freund A, Leiz S, Stephani U, Boor R, Holthausen H, Helbig I, Kluger G. A retrospective study of the relation between vaccination and occurrence of seizures in Dravet syndrome. *Epilepsia* 2011; 52: 175-8.
- Tsuda MC, Yamaguchi N, Ogawa S. Early life stress disrupts peripubertal development of aggression in male mice. *Neuroreport* 2011; 22: 259-63.
- van Dijk RM, Koska I, Bleich A, Tolba R, Seiffert I, Möller C, Di Liberto V, Talbot SR, Potschka H. Design of composite measure schemes for comparative severity assessment in animal-based neuroscience research: A case study focussed on rat epilepsy models. *PLoS One* 2020; 15: e0230141.
- van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet* 2009; 374: 635-45.
- Vekovischeva OY, Zamanillo D, Echenko O, Seppälä T, Uusi-Oukari M, Honkanen A, Seeburg PH, Sprengel R, Korpi ER. Morphine-induced dependence and sensitization are altered in mice deficient in AMPA-type glutamate receptor-A subunits. *J Neurosci* 2001; 21: 4451-9.
- Venditti C, Musa-Veloso K, Lee HY, Poon T, Mak A, Darch M, Juana J, Fronda D, Noori D, Pateman E, Jack M. Determinants of Sweetness Preference: A Scoping Review of Human Studies. *Nutrients* 2020; 12
- Verheyen K, Wyers L, Del Felice A, Schoonjans AS, Ceulemans B, Van de Walle P, Halleman A. Independent walking and cognitive development in preschool children with Dravet syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2021; 63: 472-9.
- Villas N, Meskis MA, Goodliffe S. Dravet syndrome: Characteristics, comorbidities, and caregiver concerns. *Epilepsy Behav* 2017; 74: 81-6.
- Vogt MA, Elkin H, Pfeiffer N, Sprengel R, Gass P, Inta D. Impact of adolescent GluA1 AMPA receptor ablation in forebrain excitatory neurons on behavioural correlates of mood disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2014; 264: 625-9.
- Voikar V, Gaburro S. Three Pillars of Automated Home-Cage Phenotyping of Mice: Novel Findings, Refinement, and Reproducibility Based on Literature and Experience. *Front Behav Neurosci* 2020; 14: 575434.

- Wallace A, Wirrell E, Kenney-Jung DL. Pharmacotherapy for Dravet Syndrome. *Paediatr Drugs* 2016; 18: 197-208.
- Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 1976; 83: 482-504.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420: 520-62.
- Weber EM, Olsson IAS. Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: An ethological review. *Applied Animal Behaviour Science* 2008; 114: 1-22.
- Weegh N, Fünér J, Janke O, Winter Y, Jung C, Struve B, Wassermann L, Lewejohann L, Bleich A, Häger C. Wheel running behaviour in group-housed female mice indicates disturbed wellbeing due to DSS colitis. *Lab Anim* 2020; 54: 63-72.
- Weegh N, Zentrich E, Zechner D, Struve B, Wassermann L, Talbot SR, Kumstel S, Heider M, Vollmar B, Bleich A, Häger C. Voluntary wheel running behaviour as a tool to assess the severity in a mouse pancreatic cancer model. *PLoS One* 2021; 16: e0261662.

- Wegener E, Brendel C, Fischer A, Hülsmann S, Gärtner J, Huppke P. Characterization of the MeCP2R168X knockin mouse model for Rett syndrome. *PLoS One* 2014; 9: e115444.
- Wei T, Simko V. R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix. (Version 0.9.2), <https://github.com/taiyun/corrplot>. 2021.
- Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>. 2016.
- Wiedholz LM, Owens WA, Horton RE, Feyder M, Karlsson RM, Hefner K, Sprengel R, Celikel T, Daws LC, Holmes A. Mice lacking the AMPA GluR1 receptor exhibit striatal hyperdopaminergia and 'schizophrenia-related' behaviors. *Mol Psychiatry* 2008; 13: 631-40.
- Williams E, Scott JP. THE DEVELOPMENT OF SOCIAL BEHAVIOR PATTERNS IN THE MOUSE, IN RELATION TO NATURAL PERIODS 1). *Behaviour* 1954; 6: 35-64.
- Wilmouth CE, Spear LP. Hedonic sensitivity in adolescent and adult rats: taste reactivity and voluntary sucrose consumption. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 92: 566-73.
- Wodarski R, Delaney A, Ultenius C, Morland R, Andrews N, Baastrup C, Bryden LA, Caspani O, Christoph T, Gardiner NJ, Huang W, Kennedy JD, Koyama S, Li D, Ligocki M, Lindsten A, Machin I, Pekcec A, Robens A, Rotariu SM, Vo BS, Segerdahl M, Stenfors C, Svensson CI, Treede RD, Uto K, Yamamoto K, Rutten K, Rice AS. Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study. *Pain* 2016; 157: 2350-65.
- Yang AC, Tsai SJ. New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *Int J Mol Sci* 2017; 18.
- Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T, Catterall WA. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* 2006; 9: 1142-9.
- Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Köster HJ, Borchardt T, Worley P, Lübke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B. Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 1999; 284: 1805-11.
- Zeldovich L. RFID: untangling mutant phenotypes. *Lab Anim (NY)* 2016; 45: 427-30.
- Zentrich E, Talbot SR, Bleich A, Häger C. Automated Home-Cage Monitoring During Acute Experimental Colitis in Mice. *Front Neurosci* 2021; 15: 760606.

- Zhang J, Liu H, Li J, Lou L, Zhang S, Feng D, Feng X. Exposure to deltamethrin in adolescent mice induced thyroid dysfunction and behavioral disorders. *Chemosphere* 2020; 241: 125118.
- Zhou L, Gao Q, Nie M, Gu JL, Hao W, Wang L, Cao JM. Degeneration and energy shortage in the suprachiasmatic nucleus underlies the circadian rhythm disturbance in ApoE(-/-) mice: implications for Alzheimer's disease. *Sci Rep* 2016; 6: 36335.
- Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH. Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology* 2011; 76: 594-600.
- Zuberi SM, Wirrell E, Yozawitz E, Wilmshurst JM, Specchio N, Riney K, Pressler R, Auvin S, Samia P, Hirsch E, Galicchio S, Triki C, Snead OC, Wiebe S, Cross JH, Tinuper P, Scheffer IE, Perucca E, Moshé SL, Nabbout R. ILAE classification and definition of epilepsy syndromes with onset in neonates and infants: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia* 2022; 63: 1349-97.

IX. ANHANG

Die in dieser Dissertationsschrift aus Gründen der besseren Lesbarkeit für Personen verwendete männliche Form bezieht sich stets auf Personen jeden Geschlechts.

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1. PCR (Elektrophoresegel, Agarose 5 %), <i>Scn1a</i> -A1783V-Modell.....	Seite 42
Abbildung 2. PCR (Elektrophoresegel, Agarose 5 %), <i>Grial</i> -Modell.....	Seite 45
Abbildung 3. Schematische Übersicht über eine Versuchswoche (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse).....	Seite 47
Abbildung 4. Schematische Übersicht des Versuchsablaufs im <i>Scn1a</i> -A1783V- und <i>Grial</i> -Modell.....	Seite 50
Abbildung 5. Saccharinpräferenz und Wühlverhalten (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse).....	Seite 59
Abbildung 6. Nestbauverhalten (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse).....	Seite 61
Abbildung 7. Laufaktivität (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse).....	Seite 62
Abbildung 8. Open-Field-Test (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse).....	Seite 64
Abbildung 9. Irwin-Score, Körpertemperatur, Körpergewicht und fäkale Kortikosteronmetaboliten (FCM; C57BL/6 Wildtyp-Mäuse).....	Seite 67
Abbildung 10. Saccharinpräferenz (<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 68
Abbildung 11. Wühlverhalten (<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 69
Abbildung 12. Nestbauverhalten (<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 71
Abbildung 13. Gesamtaktivität im PhenoTyper-Käfig (<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 73
Abbildung 14. Zonenspezifische Aktivität im PhenoTyper-Käfig (<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 74
Abbildung 15. Open-Field-Test (<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 76
Abbildung 16. Open-Field-Test (<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 77
Abbildung 17. Irwin-Score und Körpertemperatur (<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 78
Abbildung 18. Fäkale Kortikosteronmetaboliten (FCM; <i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 79
Abbildung 19. Körpergewicht (<i>Scn1a</i> -A1783V-Modell).....	Seite 80

Abbildung 20. Wärmebildbasierte Wurfüberwachung im Heimkäfig (<i>Scn1a-A1783V</i> -Modell).....	Seite 81
Abbildung 21. Saccharinpräferenz (<i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 82
Abbildung 22. Wühlverhalten (<i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 83
Abbildung 23. Nestbauverhalten (<i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 84
Abbildung 24. Laufradaktivität (<i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 85
Abbildung 25. Gesamtaktivität im Heimkäfig (<i>Gria1</i> -Modell)	Seite 86
Abbildung 26. Zonenspezifische Heimkäfigaktivität (<i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 87
Abbildung 27. Open-Field-Test (<i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 89
Abbildung 28. Open-Field-Test (<i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 90
Abbildung 29. Irwin-Score und Körpertemperatur (<i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 91
Abbildung 30. Fäkale Kortikosteronmetaboliten (FCM; <i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 92
Abbildung 31. Körpergewicht (<i>Gria1</i> -Modell).....	Seite 93
Abbildung 32. <i>Heatmap</i> -Korrelationsmatrix (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, Adoleszenz).....	Seite 96
Abbildung 33. <i>Heatmap</i> -Korrelationsmatrix (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, adulte Tiere).....	Seite 97
Abbildung 34. <i>Heatmap</i> -Korrelationsmatrix (<i>Scn1a-A1783V</i> -Modell, frühe Adoleszenz).....	Seite 98
Abbildung 35. <i>Heatmap</i> -Korrelationsmatrix (<i>Scn1a-A1783V</i> -Modell, späte Adoleszenz).....	Seite 99
Abbildung 36. <i>Heatmap</i> -Korrelationsmatrix (<i>Gria1</i> -Modell, frühe Adoleszenz)	Seite 100
Abbildung 37. <i>Heatmap</i> -Korrelationsmatrix (<i>Gria1</i> -Modell, späte Adoleszenz)	Seite 101
Abbildung 38. Hauptkomponentenanalyse (PCA).....	Seite 104

Tabelle 1. Überblick über die Stadien der Individualentwicklung der Maus	<i>Seite 6</i>
Tabelle 2. Übersicht über die Zeitpunkte und Parameter, die bei der Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien gemäß Bf3R berücksichtigt werden.....	<i>Seite 17</i>
Tabelle 3. Übersicht über die Krankheitsstadien des Dravet-Syndroms im Verlauf der Entwicklung.....	<i>Seite 21</i>
Tabelle 4. Gruppenzuordnung der Versuchstiere und Aufschlüsselung der Altersspannen.....	<i>Seite 48</i>
Tabelle 5. Überblick über die im Rahmen der Korrelationsanalyse nach Spearman analysierten Parameter.....	<i>Seite 95</i>
Tabelle 6. Auflistung der top 5 Kandidatenparameter der Hauptkomponenten PC1 und PC2 für die PCA des <i>Scn1a</i> -A1783V-Modells zum Zeitpunkt der frühen und späten Adoleszenz.....	<i>Seite 105</i>
Tabelle 7. Auflistung der top 5 Kandidatenparameter der Hauptkomponenten PC1 und PC2 für die PCA des <i>Grial</i> -Modells zum Zeitpunkt der frühen und späten Adoleszenz.....	<i>Seite 105</i>

2. Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage acculab ATILON	Acculab Corporation, New York, USA
Analysenwaage CPA124 5-0CE	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Chemilumineszenz-Detektionssystem Fusion SL Advance 4.2 Vilber Lourmat Peqlab	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Elektrophoresegerät (Microcomputer Electrophoresis power supply, 300 V – 1000 mA), Modell E831	Consort BVBA Turnhout, Belgien
FLIR Lepton 3.5 Micro thermal camera module	Teledyne FLIR LLC, Wilsonville, USA
Gelkammer und -kamm EasyCast	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Luxmeter (Light meter, MS 1300, Voltcraft)	Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ MR3001	VWR International, LLC., Radnor, USA
Makrolon-Typ-II und Typ-III-Käfige und Trinkflaschen	Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
Mikrowelle 900 Watt	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Mikrozentrifuge MIKRO 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
PhenoTyper Käfigsystem	Noldus, Wageningen, Niederlande
PCR-Thermocycler TProfessional Basic	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Schüttler Stuart SI 50 Orbital Shaking	Stuart Scientific Co. Ltd, Nottingham,

Incubator	Großbritannien
USB-Webcam-Breakout-Board PureThermal 2 Smart-I/O-Board	Teledyne FLIR LLC, Wilsonville, USA
Videokameras	Conrad Elektronik, München, Deutschland CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

3. Software

Software	Hersteller
EthoVisionXT 8.5, EthoVision XT 15	Noldus, Wageningen, Niederlande; RRID:SCR_000441
Fusion Capt Advance Software	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
GraphPad Prism Version 5.04	San Diego, CA, USA; RRID:SCR_002798
Lepton Windows User App: FLIR Lepton Application version 1.3.2	Teledyne FLIR LLC, Wilsonville, USA
R Version 4.0.2 und 4.1.2	R Core Team, 2020.
R-packages:	R-packages:
1) ARTool Version 2.1.2	1) Washington, DC, USA; Wobbrock et al., 2011; Elkin et al. 2021
2) corrplot Version 0.9.2	2) Wei & Simko, 2021.
3) ggplot2	3) Wickham, 2016; RRID:SCR_014601

4. Lösungen, Medikamente, Substanzen

Lösungen

Dextrose-Lösung (10 %)

- Dextrose (DextroEnergy, Krefeld, Deutschland)
- Leitungswasser

Saccharin-Lösung (0.1 %)

- Saccharin \geq 98% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Leitungswasser

TAE-(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer

- TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure (\geq 99.8 %) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Disodium-EDTA (Disodium- Ethylendiamintetraacetat; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Aqua bidest.

Medikamente

Medikament	Hersteller
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Diazepam (Diazepam-ratiopharm®)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Metamizol (Vetalgin®)	MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung, isoton	B. Braun Vet Care GmbH, Melsungen, Deutschland
Pentobarbital (Narcoren®)	Merial GmbH, Hallbergmoos,

Deutschland

Pentobarbital (Narkodorm®)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
----------------------------	-------------------------------------------------------------

Substanzen

Medikament	Hersteller
Agarose Standard, ROTI®Garose für die DNA/RNA-Elektrophorese	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dextrose	DextroEnergy GmbH & Co. KG, Krefeld, Deutschland
Disodium-EDTA (Disodium-Ethylendiamintetraacetat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (≥ 99.8 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler Express DNA Ladder, SM1553	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Methanol (≥ 99,8 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ROTI®GelStain (Ethidiumbromid-Ersatz)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Saccharin ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol (≥ 99.5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

PCR-Kit

Produkt	Hersteller
Phire Tissue Direct PCR Master Mix, F170L	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

Primer

Basensequenz	Bezeichnung	Hersteller
5'-AAT GCC TAG TAC TAT AGT GCA CG-3'	GLU-1005	metabion international AG, Planegg, Deutschland
5'-CTG CCT GGG TAA AGT GAC TTG G-3'	GLU-3intro3'	metabion international AG, Planegg, Deutschland
5'-CAC TCA CAG CAA TGA AGC AG-3'	GLU-2x1Lox-pz	metabion international AG, Planegg, Deutschland
5'-TTC ATA GAG ACA AGG AAT GTG TCC-3'	Hprt Common	metabion international AG, Planegg, Deutschland
5'-CTG GTG CTT TAC GGT ATC GC-3'	Hprt Mutant Reverse	metabion international AG, Planegg, Deutschland
5'-AAT CCA GCA GGT CAG CAA AG-3'	Hprt WT Reverse	metabion international AG, Planegg, Deutschland
5'-GCA CCT CTC CTC CTT AGA ACA-3'	SCN Common	metabion international AG, Planegg, Deutschland
5'- GCA ACT CTT CAC ATG GTA CTT TCA-3'	SCN FORWARD	metabion international AG, Planegg, Deutschland
5'- GGA GAA ACA CGA GCA GGA AG-3'	SCN Mutant Forward	metabion international AG, Planegg, Deutschland

5. Modifizierter Irwin-Test

Parameter, die im Heimkäfig der Tiere erfasst wurden:

1) Körperhaltung

- 2 flach, liegend auf der Seite oder auf dem Bauch, kein Muskeltonus
- 1 teilweise konservierter Muskeltonus, gelegentliche posturale Korrekturen
- 0 normale Haltung
- +1 starre oder verkrampfte Haltung (z.B. Opisthotonus)
- +2 Tiere zeigen keine Ruheposition, können daher nicht ausgewertet werden

2) Beckenhöhe

- 1 abgeflacht
- 0 kaum verändert
- +1 etwas erhöht

3) Schwanzhöhe

- 1 Nachschleifen des Schwanzes beim Gehen
- 0 normale Schwanzposition
- +1 Aufgestellter Schwanz (max. 90 ° Winkel) während Ruhe und Aktivitätsperiode, tw. Schwanzschlagen
- +2 Schwanz über dem Körper aufgestellt (Straub-Phänomen)

4) Beinrotation (nach außen)

- 0 nicht vorhanden
- +1 leicht
- +2 deutlich

5) Spontane lokomotorische Aktivität

- 2 keine Aktivität
- 1 verminderte Bewegung, gelegentliches Putzverhalten
- 0 normale Aktivität
- +1 erhöhte, u. U. kraftvolle, u. U. winklige Bewegungen
- +2 ruheloser Bewegungstyp

6) Ptosis (Lidschluss)

- 0 Augenlider geöffnet
- +1 Augenlid partiell offen
- +2 Augenlider geschlossen

7) Exophthalmus

- 0 kein Exophthalmus
- +1 leichter Exophthalmus
- +2 ausgeprägter Exophthalmus

8) Tränenfluss

- 0 kein Tränenfluss
- +2 Tränenfluss vorhanden

9) Hypersalivation

- 0 keine Hypersalivation
- +1 Hypersalivation vorhanden

10) Atmung

- +2 Schnappatmung, akute Atemnot
- 1 verminderte, unregelmäßige, angespannte Atmung
- 0 normale Atmung
- +1 erhöhte Atemfrequenz
- +2 wie +1, aber auch während der Ruheperioden

11) Piloerektion

- 0 nicht vorhanden
- + 1 ggrd.-mgrd. vorhanden
- +2 hgrd. vorhanden

12) Ataxie

- 0 keine Ataxie
- +1 Koordinationsprobleme beim Laufen
- +2 Verlust der Bewegungskoordination

13) Stereotypien

- 0 keine
- +2 vorhanden

14) Freezing – auf Anwesenheit des Untersuchers im Raum

- 0 kein Freezing
- +1 leichtes Freezing sichtbar
- +2 deutliches, abruptes Freezing sichtbar

15) Zittern

- 0 nicht vorhanden
- +2 vorhanden

16) Zuckungen

- 0 nicht vorhanden
- +2 vorhanden

17) Anfälle

- 0 nicht vorhanden
- +2 vorhanden

18) Vokalisation

- 0 keine Vokalisation
- +1 zeitweise spontan auftretendes leises Piepsen
- +2 häufigeres, spontan auftretendes stärkeres Piepsen

Parameter, die während der Observation in der Arena des Open-Field-Tests erfasst wurden:

1) Ataxie

- 0 keine Ataxie
- +1 Koordinationsprobleme beim Laufen
- +2 Verlust der Bewegungskoordination

2) Freezing – nach Einsetzen in die Open-Field-Arena

- 0 kein Freezing
- +1 leichtes Freezing sichtbar
- +2 deutliches, abruptes Freezing

3) Zittern

- 0 nicht vorhanden
- +2 vorhanden

4) Zuckungen

- 0 nicht vorhanden
- +2 vorhanden

5) Anfälle

- 0 nicht vorhanden
- +2 vorhanden

6) Vokalisation

- 0 keine Vokalisation
- +1 zeitweise spontan auftretendes leises Piepsen
- +2 häufigeres, spontan auftretendes stärkeres Piepsen

Parameter, die im Einzelkäfig oder im Rahmen des *Handlings* der Tiere erfasst wurden:

1) Zittern

- 0 nicht vorhanden
- +2 vorhanden

2) Zuckungen

- 0 nicht vorhanden
- +2 vorhanden

3) Anfälle

- 0 keine
- +2 vorhanden

4) Vokalisation

- 0 keine Vokalisation
- +1 zeitweise spontan auftretendes leises Piepsen
- +2 häufigeres, spontan auftretendes stärkeres Piepsen

5) Neugier (auf Zeigen eines Stiftes hin)

- 2 keine Reaktion
- 1 verminderte Neugier
- 0 normal, Interesse an präsentiertem Objekt
- +1 ruckartige Verfolgung, keine Anpassung auch bei wiederholtem Entzug
- +2 Angriffsverhalten

6) Berührungsreaktion

- 2 Ausfall, auch stärkere Reize bleiben ohne Reaktion

-1 nach mehrfachem oder verstärktem Stimulus langsame, abgeschwächte Reaktion (Ducken, Entweichen)
0 normale Reaktion auf leichte Berührung
+1 Ausweichen oder Ducken auf leichte Berührung
+2 Flucht über größere Distanz, Angriffsverhalten, Vokalisierung auf leichte Berührung

7) *Schreckhaftigkeit*

-2 keine Reaktion
-1 verzögerte oder weniger Reaktion
0 normal
+1 Flucht
+2 starke Reaktion, Zukneifen der Augen, Anlegen der Ohren, Ducken auf dem Boden oder vorübergehendes Einfrieren

8) *Reizbarkeit – Beißneigung (Handling)*

0 keine
+1 leichte
+2 deutliche

9) *Körpertonus bei Handling*

-2 völlig schlaff
-1 reduzierter Muskeltonus
0 normaler Muskeltonus
+1 erhöhter Muskeltonus
+2 steif

10) *Bauchdeckenspannung (Handling)*

-1 reduzierter Muskeltonus
0 normal
+1 erhöhte Muskelspannung

11) *Harnabsatz (Handling)*

0 kein Harnabsatz
+1 vorhanden

12) *Kotabsatz (Handling)*

0 kein Kotabsatz
+1 vorhanden

13) *Fäzes*

-1 kein oder kaum Kot im Käfig
0 Kotbeschaffenheit und Menge normal
+1 Kotmenge deutlich erhöht
+2 fast flüssiger Kot, Durchfall

14) *Stellreflex*

Nur zu testen, falls Tier ununterbrochen liegt
-2 nicht vorhanden
-1 reduziert
0 keine Änderung

6. Korrelationsanalysen: *r*- und *p*-Werte

Korrelationsanalyse nach Spearman (adoleszente C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, Gruppen P25, P36 und P50): *r*-Werte.

	Temp	Irw_	OF_Zent	OF_Wand	OF_Sprünge	OF_Rearing	OF_Immobil	OF_Dist	VWR	Nest	BUR_Du_2	BUR_Hell_2	BUR_Du_1	BUR_Hell_1	Sp	<i>r</i> -Wert
FCM	0,05	-0,15	-0,15	0,01	-0,12	-0,26	0,08	-0,08	-0,39	-0,14	-0,17	-0,06	-0,17	-0,04	1	Sp
	-0,38	0,11	-0,13	-0,13	0,02	0,21	0,23	0,01	0,09	0,01	0,13	0,13	0,28	1	-0,04	BUR_Hell_1
	-0,5	0,03	0	-0,12	0,18	0,3	-0,03	0,45	0,54	0,04	0,45	0,45	1	0,28	-0,17	BUR_Du_1
	-0,18	0	0,27	0,04	-0,08	0,26	-0,14	0,31	0,15	-0,08	0,41	1	0,45	0,13	-0,06	BUR_Hell_2
	-0,39	0,09	0,01	-0,23	0,24	0,26	0,02	0,37	0,43	-0,04	1	0,41	0,81	0,3	-0,17	BUR_Du_2
	-0,07	0,32	0,15	-0,01	0,04	0,1	-0,23	0,18	0,37	1	-0,04	-0,08	0,04	0,01	-0,14	Nest
	-0,37	0,29	0,1	0,09	-0,08	0,27	0,5	0,43	1	0,37	0,43	0,15	0,54	0,09	-0,39	VWR
	-0,17	0,24	0,05	0,01	0,36	0,43	-0,61	1	0,43	0,18	0,37	0,31	0,45	0,01	-0,08	OF_Dist
	-0,21	-0,07	-0,28	-0,14	-0,08	0,05	1	-0,61	-0,16	-0,23	0,02	-0,14	-0,03	0,23	0,08	OF_Immobil
	-0,23	0,28	-0,27	-0,06	0,3	1	0,05	0,43	0,5	0,1	0,26	0,26	0,3	0,21	-0,26	OF_Rearing
	-0,11	0,07	-0,09	-0,23	0,21	1	-0,08	0,36	0,27	0,04	0,24	-0,08	0,18	0,02	-0,12	OF_Sprünge
	0,14	0,06	0,11	-0,59	1	0,21	-0,14	0,01	-0,08	0,09	-0,23	-0,11	-0,12	-0,13	0,01	OF_Wand
	0,06	-0,06	-0,01	1	-0,59	-0,23	-0,16	0	0,09	-0,01	0,01	0,04	0	-0,13	-0,15	OF_Zent
	-0,06	-0,01	1	-0,01	0,11	-0,09	-0,28	0,05	0,1	0,15	0,2	0,27	0,23	-0,1	-0,15	Irw
	0,1	1	-0,01	-0,06	0,06	0,07	-0,07	0,24	0,29	0,32	0,09	0	0,03	0,11	-0,17	Temp
	1	0,1	-0,06	0,06	0,14	-0,11	-0,21	-0,17	-0,37	-0,07	-0,39	-0,18	-0,5	-0,38	0,05	FCM

Korrelationsanalyse nach Spearman (adoleszente C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, Gruppen P25, P36 und P50): *p*-Werte.

<i>FCM</i>	<i>Temp</i>	<i>Inw</i>	<i>OF_Zent</i>	<i>OF_Wand</i>	<i>OF_Sprünge</i>	<i>OF_Rearing</i>	<i>OF_Immobil</i>	<i>OF_Dist</i>	<i>VWR</i>	<i>Nest</i>	<i>BUR_Du_2</i>	<i>BUR_Hell_2</i>	<i>BUR_Du_1</i>	<i>BUR_Hell_1</i>	<i>Sp</i>	<i>p-Wert</i>
0,58	0,07	0,10	0,11	0,87	0,20	0,00	0,38	0,40	0,00	0,12	0,07	0,53	0,07	0,65	NA	<i>Sp</i>
0,00	0,23	0,27	0,15	0,15	0,79	0,02	0,01	0,93	0,33	0,89	0,00	0,15	0,00	NA	0,65	<i>BUR_Hell_1</i>
0,00	0,78	0,01	0,97	0,18	0,05	0,00	0,74	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00	NA	0,00	0,07	<i>BUR_Du_1</i>
0,05	0,97	0,00	0,66	0,25	0,40	0,00	0,12	0,00	0,10	0,38	0,00	NA	0,00	0,15	0,53	<i>BUR_Hell_2</i>
0,00	0,33	0,02	0,89	0,01	0,01	0,00	0,85	0,00	0,00	0,66	NA	0,00	0,00	0,00	0,07	<i>BUR_Du_2</i>
0,48	0,00	0,11	0,91	0,35	0,69	0,26	0,01	0,05	0,00	NA	0,66	0,38	0,64	0,89	0,12	<i>Nest</i>
0,00	0,00	0,28	0,33	0,38	0,00	0,00	0,08	0,00	NA	0,00	0,00	0,10	0,00	0,33	0,00	<i>VWR</i>
0,06	0,01	0,58	0,98	0,95	0,00	0,00	0,00	NA	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,93	0,40	<i>OF_Dist</i>
0,02	0,43	0,00	0,08	0,14	0,36	0,56	NA	0,00	0,08	0,01	0,85	0,12	0,74	0,01	0,38	<i>OF_Immobil</i>
0,01	0,00	0,00	0,50	0,24	0,00	NA	0,56	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	<i>OF_Rearing</i>
0,21	0,43	0,33	0,01	0,02	NA	0,00	0,36	0,00	0,00	0,69	0,01	0,40	0,05	0,79	0,20	<i>OF_Sprünge</i>
0,13	0,49	0,22	0,00	NA	0,02	0,24	0,14	0,95	0,38	0,35	0,01	0,25	0,18	0,15	0,87	<i>OF_Wand</i>
0,54	0,48	0,94	NA	0,00	0,01	0,50	0,08	0,98	0,33	0,91	0,89	0,66	0,97	0,15	0,11	<i>OF_Zent</i>
0,52	0,94	NA	0,94	0,22	0,33	0,00	0,00	0,58	0,28	0,11	0,02	0,00	0,01	0,27	0,10	<i>Inw</i>
0,28	NA	0,94	0,48	0,49	0,43	0,00	0,43	0,01	0,00	0,00	0,33	0,97	0,78	0,23	0,07	<i>Temp</i>
NA	0,28	0,52	0,54	0,13	0,21	0,01	0,02	0,06	0,00	0,48	0,00	0,05	0,00	0,00	0,58	<i>FCM</i>

Korrelationsanalyse nach Spearman (reif adulte C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, Gruppe P120):
r-Werte.

FCM	Temp	Irww	OF_Zent	OF_Wand	OF_Springe	OF_Rearing	OF_Immobil	OF_Dist	VWR	Nest	BUR_Du_2	BUR_Hell_2	BUR_Du_1	BUR_Hell_1	Sp	r-Wert
-0,26	-0,26	0,11	0,16	-0,1	0,25	-0,04	-0,3	-0,1	-0,8	-0,15	-0,07	0	-0,1	0,17	1	Sp
-0,01	0,27	0,2	0,17	-0,15	-0,02	0,24	0	0,19	-0,29	0,2	0,16	-0,04	0,25	1	0,17	BUR_Hell_1
0,05	0,03	0,31	-0,32	0,41	-0,3	0,4	0,31	0,17	-0,12	0,03	0,78	0,47	1	0,25	-0,1	BUR_Du_1
-0,19	-0,11	0,01	-0,2	0,06	-0,12	0,17	0,06	0,03	-0,34	-0,04	0,47	1	0,47	-0,04	0	BUR_Hell_2
-0,17	-0,07	0,19	-0,3	0,41	-0,29	0,29	0,42	0,06	-0,22	0,29	1	0,47	0,78	0,16	-0,07	BUR_Du_2
0,13	0,57	-0,11	0,05	-0,09	-0,36	-0,04	0,14	0	0,21	1	0,29	-0,04	0,03	0,2	-0,15	Nest
0,47	0,38	-0,09	-0,08	0,08	-0,26	-0,13	0,26	0,02	1	0,21	-0,22	-0,34	-0,12	-0,29	-0,8	VWR
0,05	0,09	-0,15	-0,07	0,08	0,08	0,46	-0,32	1	0,02	0	0,06	0,03	0,17	0,19	-0,1	OF_Dist
0,17	0,04	0,17	0,1	0,23	-0,57	-0,08	1	-0,32	0,26	0,14	0,42	0,06	0,31	0	-0,3	OF_Immobil
-0,15	-0,14	0,23	-0,13	0,33	-0,05	1	-0,08	0,46	-0,13	-0,04	0,29	0,17	0,4	0,24	-0,04	OF_Rearing
-0,28	-0,13	-0,01	-0,2	-0,02	1	-0,05	-0,57	0,08	-0,26	-0,36	-0,29	-0,12	-0,3	-0,02	0,25	OF_Springe
0,03	-0,2	0,23	-0,52	1	-0,02	0,33	0,23	0,08	0,08	-0,09	0,41	0,06	0,41	-0,15	-0,1	OF_Wand
0,08	0,24	0,05	1	-0,52	-0,2	-0,13	0,1	-0,07	-0,08	0,05	-0,3	-0,2	-0,32	0,17	0,16	OF_Zentum
-0,04	0,1	1	0,05	0,23	-0,01	0,23	0,17	-0,15	-0,09	-0,11	0,19	0,01	0,31	0,2	0,11	Irww
0,45	1	0,1	0,24	-0,2	-0,13	-0,14	0,04	0,09	0,38	0,57	-0,07	-0,11	0,03	0,27	-0,26	Temp
1	0,45	-0,04	0,08	0,03	-0,28	-0,15	0,17	0,05	0,47	0,13	-0,17	-0,19	0,05	-0,01	-0,26	FCM

Korrelationsanalyse nach Spearman (reif adulte C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, Gruppe P120):
p-Werte.

FCM	Temp	Inw	OF_Zent	OF_Wand	OF_Sprünge	OF_Rearing	OF_Immobil	OF_Dist	VWR	Nest	BUR_Du_2	BUR_Heil_2	BUR_Du_1	BUR_Heil_1	Sp	p-Wert
0,11	0,10	0,50	0,31	0,56	0,11	0,81	0,06	0,55	0,00	0,37	0,67	0,98	0,54	0,28	NA	Sp
0,98	0,09	0,21	0,29	0,37	0,92	0,14	0,98	0,23	0,07	0,21	0,32	0,81	0,12	NA	0,28	BUR_Heil_1
0,75	0,83	0,05	0,05	0,01	0,06	0,01	0,05	0,31	0,45	0,84	0,00	0,00	NA	0,12	0,54	BUR_Du_1
0,25	0,50	0,97	0,23	0,72	0,47	0,30	0,73	0,83	0,03	0,82	0,00	NA	0,00	0,81	0,98	BUR_Heil_2
0,29	0,68	0,23	0,06	0,01	0,07	0,07	0,01	0,72	0,18	0,07	NA	0,00	0,00	0,32	0,67	BUR_Du_2
0,44	0,00	0,50	0,74	0,56	0,02	0,81	0,40	0,99	0,19	NA	0,07	0,82	0,84	0,21	0,37	Nest
0,00	0,01	0,57	0,63	0,63	0,10	0,42	0,10	0,92	NA	0,19	0,18	0,03	0,45	0,07	0,00	VWR
0,76	0,58	0,37	0,68	0,63	0,61	0,00	0,04	NA	0,92	0,99	0,72	0,83	0,31	0,23	0,55	OF_Dist
0,28	0,80	0,31	0,54	0,15	0,00	0,62	NA	0,04	0,10	0,40	0,01	0,73	0,05	0,98	0,06	OF_Immobil
0,36	0,39	0,16	0,42	0,04	0,75	NA	0,62	0,00	0,42	0,81	0,07	0,30	0,01	0,14	0,81	OF_Rearing
0,08	0,42	0,97	0,21	0,90	NA	0,75	0,00	0,61	0,10	0,02	0,07	0,47	0,06	0,92	0,11	OF_Sprünge
0,87	0,22	0,15	0,00	NA	0,90	0,04	0,15	0,63	0,63	0,56	0,01	0,72	0,01	0,37	0,56	OF_Wand
0,62	0,14	0,77	NA	0,00	0,21	0,42	0,54	0,68	0,63	0,74	0,06	0,23	0,05	0,29	0,31	OF_Zent
0,80	0,53	NA	0,77	0,15	0,97	0,16	0,31	0,37	0,57	0,50	0,23	0,97	0,05	0,21	0,50	Inw
0,00	NA	0,53	0,14	0,22	0,42	0,39	0,80	0,58	0,01	0,00	0,68	0,50	0,83	0,09	0,10	Temp
NA	0,00	0,80	0,62	0,87	0,08	0,36	0,28	0,76	0,00	0,44	0,29	0,25	0,75	0,98	0,11	FCM

Korrelationsanalyse nach Spearman (*Scn1a*-A1783V-Modell, frühe Adoleszenz): *r*-Werte.

<i>FCM</i>	<i>Temp</i>	<i>Irw</i>	<i>OF_Zent</i>	<i>OF_Wand</i>	<i>OF_Sprünge</i>	<i>OF_Rearing</i>	<i>OF_Immobil</i>	<i>OF_Dist</i>	<i>Heimk_Zent</i>	<i>Heimk_Trä</i>	<i>Heimk_Futt</i>	<i>Heimk_Vel</i>	<i>Heimk_Dist</i>	<i>Nest</i>	<i>Sp</i>	<i>r-Wert</i>
-0,32	0,04	-0,08	0,36	-0,34	0,04	-0,08	0,19	-0,09	0,17	0,15	0,02	-0,2	-0,08	0,48	1	<i>Sp</i>
0,24	0,43	-0,01	0,31	-0,48	-0,33	-0,49	0,36	-0,41	-0,16	0,07	-0,1	-0,21	-0,2	1	0,48	<i>Nest</i>
-0,02	0,03	0,11	-0,31	0,48	0,19	0,38	-0,26	0,23	0,51	0,48	0,5	0,91	1	-0,2	-0,08	<i>Heimk_Dist</i>
-0,06	0,01	0,18	-0,28	0,45	0,24	0,48	-0,4	0,36	0,31	0,29	0,33	1	0,91	-0,21	-0,2	<i>Heimk_Vel</i>
0,04	0,34	-0,23	-0,13	0,11	-0,2	-0,11	0,23	-0,21	0,57	0,64	1	0,33	0,5	-0,1	0,02	<i>Heimk_Futt</i>
0,04	0,12	-0,06	-0,12	0	-0,16	-0,21	0,31	-0,3	0,77	1	0,64	0,29	0,48	0,07	0,15	<i>Heimk_Trä</i>
-0,26	-0,08	0,09	-0,2	0,21	-0,03	0,08	0,11	-0,09	1	0,77	0,57	0,31	0,51	-0,16	0,17	<i>Heimk_Zent</i>
-0,33	-0,29	0,29	-0,3	0,39	0,63	0,89	-0,92	1	-0,09	-0,3	-0,21	0,36	0,23	-0,41	-0,09	<i>OF_Dist</i>
0,3	0,24	-0,31	0,36	-0,42	-0,6	-0,84	1	-0,92	0,11	0,31	0,23	-0,4	-0,26	0,36	0,19	<i>OF_Immobil</i>
-0,45	-0,33	0,28	-0,24	0,54	0,62	1	-0,84	0,89	0,08	-0,21	-0,11	0,48	0,38	-0,49	-0,08	<i>OF_Rearing</i>
-0,43	-0,33	0,04	-0,02	0,31	1	0,62	-0,6	0,63	-0,03	-0,16	-0,2	0,24	0,19	-0,33	0,04	<i>OF_Sprünge</i>
-0,24	-0,29	0,4	-0,61	1	0,31	0,54	-0,42	0,39	0,21	0	0,11	0,45	0,48	-0,48	-0,34	<i>OF_Wand</i>
0,05	0,11	-0,39	1	-0,61	-0,02	-0,24	0,36	-0,3	-0,2	-0,12	-0,13	-0,28	-0,31	0,31	0,36	<i>OF_Zent</i>
-0,09	-0,09	1	-0,39	0,4	0,04	0,28	-0,31	0,29	0,09	-0,06	-0,23	0,18	0,11	-0,01	-0,08	<i>Irw</i>
0,43	1	-0,09	0,11	-0,29	-0,33	-0,33	0,24	-0,29	-0,08	0,12	0,34	0,01	0,03	0,43	0,04	<i>Temp</i>
1	0,43	-0,09	0,05	-0,24	-0,43	-0,45	0,3	-0,33	-0,26	0,04	0,04	-0,06	-0,02	0,24	-0,32	<i>FCM</i>

Korrelationsanalyse nach Spearman (*Scn1a*-A1783V-Modell, frühe Adoleszenz): *p*-Werte.

FCM	Temp	Inrw	OF_Zent	OF_Wand	OF_Sprünge	OF_Rearing	OF_Immobil	OF_Dist	Heimk_Zen	Heimk_Trü	Heimk_Futt	Heimk_Vel	Heimk_Dist	Nest	Sp	<i>p</i> -Wert
0,05	0,80	0,62	0,02	0,03	0,79	0,61	0,24	0,56	0,30	0,35	0,92	0,22	0,63	0,00	NA	Sp
0,13	0,01	0,96	0,05	0,00	0,04	0,00	0,02	0,01	0,33	0,69	0,53	0,19	0,23	NA	0,00	Nest
0,89	0,86	0,49	0,06	0,00	0,25	0,02	0,11	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	0,23	0,63	Heimk_Dist
0,71	0,94	0,27	0,08	0,00	0,14	0,00	0,01	0,02	0,05	0,07	0,04	NA	0,00	0,19	0,22	Heimk_Vel
0,83	0,03	0,15	0,43	0,51	0,22	0,50	0,16	0,19	0,00	0,00	NA	0,04	0,00	0,53	0,92	Heimk_Futt
0,78	0,47	0,70	0,47	0,98	0,31	0,19	0,05	0,06	0,00	NA	0,00	0,07	0,00	0,69	0,35	Heimk_Trü
0,10	0,61	0,56	0,23	0,20	0,85	0,64	0,51	0,59	NA	0,00	0,00	0,05	0,00	0,33	0,30	Heimk_Zen
0,04	0,07	0,07	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	NA	0,59	0,06	0,19	0,02	0,15	0,01	0,56	OF_Dist
0,06	0,13	0,05	0,02	0,01	0,00	0,00	NA	0,00	0,51	0,05	0,16	0,01	0,11	0,02	0,24	OF_Immobil
0,00	0,04	0,08	0,14	0,00	0,00	NA	0,00	0,00	0,64	0,19	0,50	0,00	0,02	0,00	0,61	OF_Rearing
0,01	0,04	0,79	0,88	0,05	NA	0,00	0,00	0,00	0,85	0,31	0,22	0,14	0,25	0,04	0,79	OF_Sprünge
0,14	0,07	0,01	0,00	NA	0,05	0,00	0,01	0,01	0,20	0,98	0,51	0,00	0,00	0,00	0,03	OF_Wand
0,74	0,50	0,01	NA	0,00	0,88	0,14	0,02	0,06	0,23	0,47	0,43	0,08	0,06	0,05	0,02	OF_Zent
0,57	0,58	NA	0,01	0,01	0,79	0,08	0,05	0,07	0,56	0,70	0,15	0,27	0,49	0,96	0,62	Inrw
0,01	NA	0,58	0,50	0,07	0,04	0,04	0,13	0,07	0,61	0,47	0,03	0,94	0,86	0,01	0,80	Temp
NA	0,01	0,57	0,74	0,14	0,01	0,00	0,06	0,04	0,10	0,78	0,83	0,71	0,89	0,13	0,05	FCM

Korrelationsanalyse nach Spearman (*Scn1a*-A1783V-Modell, späte Adoleszenz): *r*-Werte.

<i>FCM</i>	<i>Temp</i>	<i>IrW</i>	<i>OF_Zent</i>	<i>OF_Wand</i>	<i>OF_Sprünge</i>	<i>OF_Rearing</i>	<i>OF_Immobil</i>	<i>OF_Dist</i>	<i>Heimk_Zent</i>	<i>Heimk_Trä</i>	<i>Heimk_Futt</i>	<i>Heimk_Vel</i>	<i>Heimk_Dist</i>	<i>Nest</i>	<i>BUR_Du_2</i>	<i>BUR_Du_1</i>	<i>BUR_Heil_2</i>	<i>BUR_Heil_1</i>	<i>Sp</i>	<i>r-Wert</i>
-0,12	0,56	-0,13	0	-0,06	-0,45	-0,52	0,6	-0,53	0,56	0,66	0,66	0,59	0,66	0,08	0,62	0,74	0,3	0,19	1	<i>Sp</i>
0,12	0,31	-0,04	0,16	-0,15	-0,07	-0,22	0,23	-0,12	-0,09	-0,01	0,17	0,26	0,06	0,12	0,4	0,27	0,24	1	0,19	<i>BUR_Heil_1</i>
-0,11	0,19	-0,16	-0,03	0,02	-0,23	-0,14	0,05	-0,05	0,24	0,35	0,41	0,34	0,35	-0,03	0,23	0,25	1	0,24	0,3	<i>BUR_Heil_2</i>
0,14	0,57	-0,33	0,13	-0,27	-0,63	-0,63	0,69	-0,69	0,54	0,82	0,71	0,51	0,66	0,18	0,89	1	0,25	0,27	0,74	<i>BUR_Du_1</i>
0,27	0,51	-0,28	0,18	-0,32	-0,68	-0,72	0,73	-0,76	0,6	0,77	0,69	0,49	0,65	0,41	1	0,89	0,23	0,4	0,62	<i>BUR_Du_2</i>
0,5	0,05	0,02	0,15	-0,21	-0,44	-0,38	0,34	-0,38	0,4	0,21	0,4	0,16	0,17	1	0,41	0,18	-0,03	0,12	0,08	<i>Nest</i>
0,05	0,4	-0,18	-0,04	-0,02	-0,52	-0,47	0,52	-0,51	0,78	0,82	0,78	0,79	1	0,17	0,65	0,66	0,35	0,06	0,66	<i>Heimk_Dist</i>
0,01	0,52	-0,03	0,02	0,05	-0,46	-0,37	0,49	-0,34	0,63	0,6	0,59	1	0,79	0,16	0,49	0,51	0,34	0,26	0,59	<i>Heimk_Vel</i>
0,16	0,4	-0,37	0,11	-0,23	-0,63	-0,56	0,62	-0,61	0,69	0,74	1	0,59	0,78	0,4	0,69	0,71	0,41	0,17	0,66	<i>Heimk_Futt</i>
0,11	0,48	-0,38	-0,05	-0,09	-0,64	-0,64	0,62	-0,67	0,8	1	0,74	0,6	0,82	0,21	0,77	0,82	0,35	-0,01	0,66	<i>Heimk_Trä</i>
0,18	0,23	-0,26	-0,21	0,06	-0,61	-0,59	0,54	-0,6	1	0,8	0,69	0,63	0,78	0,4	0,6	0,54	0,24	-0,09	0,56	<i>Heimk_Zent</i>
-0,43	-0,37	0,5	-0,12	0,28	0,65	0,92	-0,93	1	-0,6	-0,67	-0,61	-0,34	-0,51	-0,38	-0,76	-0,69	-0,05	-0,12	-0,53	<i>OF_Dist</i>
0,36	0,54	-0,45	0,26	-0,31	-0,63	-0,9	1	-0,93	0,54	0,62	0,62	0,49	0,52	0,34	0,73	0,69	0,05	0,23	0,6	<i>OF_Immobil</i>
-0,31	-0,42	0,45	-0,07	0,22	0,57	1	-0,9	0,92	-0,59	-0,64	-0,56	-0,37	-0,47	-0,38	-0,72	-0,63	-0,14	-0,22	-0,52	<i>OF_Rearing</i>
-0,3	-0,35	0,29	-0,14	0,18	1	0,57	-0,63	0,65	-0,61	-0,64	-0,63	-0,46	-0,52	-0,44	-0,68	-0,63	-0,23	-0,07	-0,45	<i>OF_Sprünge</i>
-0,22	-0,13	0,2	-0,75	1	0,18	0,22	-0,31	0,28	0,06	-0,09	-0,23	0,05	-0,02	-0,21	-0,32	-0,27	0,02	-0,15	-0,06	<i>OF_Wand</i>
0,07	0,28	-0,06	1	-0,75	-0,14	-0,07	0,26	-0,12	-0,21	-0,05	0,11	0,02	-0,04	0,15	0,18	0,13	-0,03	0,16	0	<i>OF_Zent</i>
-0,26	-0,13	1	-0,06	0,2	0,29	0,45	-0,45	0,5	-0,26	-0,38	-0,37	-0,03	-0,18	0,02	-0,28	-0,33	-0,16	-0,04	-0,13	<i>IrW</i>
-0,15	1	-0,13	0,28	-0,13	-0,35	-0,42	0,54	-0,37	0,23	0,48	0,4	0,52	0,4	0,05	0,51	0,57	0,19	0,31	0,56	<i>Temp</i>
1	-0,15	-0,26	0,07	-0,22	-0,3	-0,31	0,36	-0,43	0,18	0,11	0,16	0,01	0,05	0,5	0,27	0,14	-0,11	0,12	-0,12	<i>FCM</i>

Korrelationsanalyse nach Spearman (*Scn1a*-A1783V-Modell, späte Adoleszenz): *p*-Werte.

FCM	Temp	lrw	OF_Zent	OF_Wand	OF_S prin ge	OF_R earin g	OF_I nmo bil	OF_D ist	Heim k_Ze nt	Heim k_Trä	Heim k_Fut t	Heim k_Vel t	Heim k_Dis t	Nest	BUR_ Du_2	BUR_ Du_1	BUR_ Heil_2	BUR_ Heil_1	Sp	<i>p</i> -Wert
0,45	0,00	0,44	1,00	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00	0,00	0,06	0,23	NA	Sp
0,47	0,05	0,81	0,32	0,34	0,67	0,17	0,16	0,47	0,57	0,94	0,30	0,11	0,70	0,47	0,01	0,10	0,14	NA	0,23	BUR_Heil_1
0,50	0,24	0,31	0,86	0,90	0,15	0,38	0,74	0,75	0,13	0,03	0,01	0,03	0,03	0,86	0,15	0,11	NA	0,14	0,06	BUR_Heil_2
0,38	0,00	0,04	0,42	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	0,00	NA	0,11	0,10	0,00	BUR_Du_1
0,09	0,00	0,08	0,26	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	NA	0,00	0,15	0,01	0,00	BUR_Du_2
0,00	0,78	0,88	0,36	0,20	0,01	0,02	0,03	0,01	0,01	0,18	0,01	0,33	0,29	NA	0,01	0,26	0,86	0,47	0,63	Nest
0,78	0,01	0,26	0,78	0,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	0,29	0,00	0,00	0,03	0,70	0,00	Heimk_Dist
0,93	0,00	0,84	0,89	0,77	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	NA	0,00	0,33	0,00	0,00	0,03	0,11	0,00	Heimk_Vel
0,33	0,01	0,02	0,48	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,30	0,00	Heimk_Futt
0,49	0,00	0,02	0,74	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,03	0,94	0,00	Heimk_Trä
0,26	0,15	0,11	0,19	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,13	0,57	0,00	Heimk_Zent
0,01	0,02	0,00	0,45	0,08	0,00	0,00	0,00	NA	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,75	0,47	0,00	OF_Dist
0,02	0,00	0,00	0,11	0,05	0,00	0,00	NA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,74	0,16	0,00	OF_Immobil
0,05	0,01	0,00	0,67	0,16	0,00	NA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,38	0,17	0,00	OF_Rearing
0,06	0,03	0,07	0,40	0,26	NA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,15	0,67	0,00	OF_Springe
0,18	0,44	0,22	0,00	NA	0,26	0,16	0,05	0,08	0,69	0,57	0,15	0,77	0,90	0,20	0,04	0,09	0,90	0,34	0,69	OF_Wand
0,67	0,08	0,70	NA	0,00	0,40	0,67	0,11	0,45	0,19	0,74	0,48	0,89	0,78	0,36	0,26	0,42	0,86	0,32	1,00	OF_Zent
0,11	0,42	NA	0,70	0,22	0,07	0,00	0,00	0,00	0,11	0,02	0,02	0,84	0,26	0,88	0,08	0,04	0,31	0,81	0,44	lrw
0,35	NA	0,42	0,08	0,44	0,03	0,01	0,00	0,02	0,15	0,00	0,01	0,00	0,01	0,78	0,00	0,00	0,24	0,05	0,00	Temp
NA	0,35	0,11	0,67	0,18	0,06	0,05	0,02	0,01	0,26	0,49	0,33	0,93	0,78	0,00	0,09	0,38	0,50	0,47	0,45	FCM

Korrelationsanalyse nach Spearman (*Gria1*-Modell, frühe Adoleszenz): *r*-Werte.

<i>FCM</i>	<i>Temp</i>	<i>Irw</i>	<i>OF_Zent</i>	<i>OF_Wand</i>	<i>OF_Sprünge</i>	<i>OF_Rearing</i>	<i>OF_#Im mobil</i>	<i>OF_Dist</i>	<i>Heimk_Zent</i>	<i>Heimk_Trä</i>	<i>Heimk_Futt</i>	<i>Heimk_Vel</i>	<i>Heimk_Dist</i>	<i>VWR</i>	<i>Nest</i>	<i>Sp</i>	<i>r</i> -Wert
0,4	0,23	-0,17	-0,29	0,25	-0,11	-0,19	-0,07	0,07	0,3	0,08	-0,02	0,1	0,21	0,17	0,15	1	<i>Sp</i>
0,14	0,21	0,2	0,36	-0,32	0,46	-0,42	0,66	-0,69	-0,32	-0,29	-0,14	-0,21	-0,18	0,17	1	0,15	<i>Nest</i>
0,36	0,06	0,03	0,15	-0,17	0,12	-0,04	0,23	-0,25	0,25	-0,07	-0,44	0,44	0,5	1	0,17	0,17	<i>VWR</i>
0,15	0,2	-0,24	-0,06	0,1	-0,08	0,01	-0,25	0,3	-0,03	0,05	0,24	0,63	1	0,5	-0,18	0,21	<i>Heimk_Dist</i>
0,41	0,04	-0,01	-0,3	0,25	-0,13	0,06	-0,33	0,32	-0,04	-0,19	-0,12	1	0,63	0,44	-0,21	0,1	<i>Heimk_Vel</i>
-0,23	0,32	-0,17	-0,04	0,08	-0,12	-0,22	-0,26	0,32	-0,29	0	1	-0,12	0,24	-0,44	-0,14	-0,02	<i>Heimk_Futt</i>
-0,09	0,07	-0,38	0,18	-0,2	0,02	0,22	-0,19	0,26	0,25	1	0	-0,19	0,05	-0,07	-0,29	0,08	<i>Heimk_Trä</i>
-0,01	-0,17	-0,22	-0,1	0,05	-0,22	0,24	-0,16	0,14	1	0,25	-0,29	-0,04	-0,03	0,25	-0,32	0,3	<i>Heimk_Zent</i>
0,14	-0,11	-0,31	-0,53	0,57	-0,52	0,38	-0,88	1	0,14	0,26	0,32	0,32	0,3	-0,25	-0,69	0,07	<i>OF_Dist</i>
-0,05	0,16	0,43	0,47	-0,51	0,53	-0,4	1	-0,88	-0,16	-0,19	-0,26	-0,33	-0,25	0,23	0,66	-0,07	<i>OF_Immobil</i>
-0,2	-0,49	-0,17	-0,04	0,17	-0,27	1	-0,4	0,38	0,24	0,22	-0,22	0,06	0,01	-0,04	-0,42	-0,19	<i>OF_Rearing</i>
-0,01	0,08	0,14	0,41	-0,5	1	-0,27	0,53	-0,52	-0,22	0,02	-0,12	-0,13	-0,08	0,12	0,46	-0,11	<i>OF_Sprünge</i>
0,12	-0,02	-0,07	-0,72	1	-0,5	0,17	-0,51	0,57	0,05	-0,2	0,08	0,25	0,1	-0,17	-0,32	0,25	<i>OF_Wand</i>
-0,14	0	0,04	1	-0,72	0,41	-0,04	0,47	-0,53	-0,1	0,18	-0,04	-0,3	-0,06	0,15	0,36	-0,29	<i>OF_Zent</i>
0,02	-0,08	1	0,04	-0,07	0,14	-0,17	0,43	-0,31	-0,22	-0,38	-0,17	-0,01	-0,24	0,03	0,2	-0,17	<i>Irw</i>
0,19	1	-0,08	0	-0,02	0,08	-0,49	0,16	-0,11	-0,17	0,07	0,32	0,04	0,2	0,06	0,21	0,23	<i>Temp</i>
1	0,19	0,02	-0,14	0,12	-0,01	-0,2	-0,05	0,14	-0,01	-0,09	-0,23	0,41	0,15	0,36	0,14	0,4	<i>FCM</i>

Korrelationsanalyse nach Spearman (*Gria1*-Modell, frühe Adoleszenz): *p*-Werte.

<i>FCM</i>	<i>Temp</i>	<i>Irw</i>	<i>OF_Zent</i>	<i>OF_Wand</i>	<i>OF_Sprünge</i>	<i>OF_Rearing</i>	<i>OF_Immobil</i>	<i>OF_Dist</i>	<i>Heimk_Zent</i>	<i>Heimk_Trä</i>	<i>Heimk_Futt</i>	<i>Heimk_Vel</i>	<i>Heimk_Dist</i>	<i>VWR</i>	<i>Nest</i>	<i>Sp</i>	<i>p-Wert</i>
0,01	0,17	0,31	0,08	0,13	0,52	0,25	0,69	0,68	0,07	0,63	0,91	0,55	0,22	0,31	0,37	NA	<i>Sp</i>
0,42	0,20	0,23	0,03	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,05	0,08	0,41	0,20	0,28	0,32	NA	0,37	<i>Nest</i>
0,03	0,74	0,84	0,38	0,31	0,46	0,83	0,16	0,14	0,13	0,69	0,01	0,01	0,00	NA	0,32	0,31	<i>VWR</i>
0,38	0,23	0,14	0,70	0,55	0,61	0,96	0,13	0,06	0,88	0,76	0,14	0,00	NA	0,00	0,28	0,22	<i>Heimk_Dist</i>
0,01	0,80	0,96	0,06	0,12	0,43	0,71	0,04	0,05	0,83	0,25	0,49	NA	0,00	0,01	0,20	0,55	<i>Heimk_Vel</i>
0,17	0,05	0,30	0,79	0,63	0,46	0,18	0,12	0,05	0,08	0,99	NA	0,49	0,14	0,01	0,41	0,91	<i>Heimk_Futt</i>
0,58	0,68	0,02	0,28	0,23	0,93	0,19	0,25	0,11	0,14	NA	0,99	0,25	0,76	0,69	0,08	0,63	<i>Heimk_Trä</i>
0,96	0,30	0,18	0,56	0,77	0,18	0,15	0,34	0,39	NA	0,14	0,08	0,83	0,88	0,13	0,05	0,07	<i>Heimk_Zen</i>
0,40	0,53	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	NA	0,39	0,11	0,05	0,05	0,06	0,14	0,00	0,68	<i>OF_Dist</i>
0,75	0,32	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	NA	0,00	0,34	0,25	0,12	0,04	0,13	0,16	0,00	0,69	<i>OF_Immobil</i>
0,24	0,00	0,30	0,80	0,30	0,10	NA	0,01	0,02	0,15	0,19	0,18	0,71	0,96	0,83	0,01	0,25	<i>OF_Rearing</i>
0,96	0,63	0,41	0,01	0,00	NA	0,10	0,00	0,00	0,18	0,93	0,46	0,43	0,61	0,46	0,00	0,52	<i>OF_Sprünge</i>
0,47	0,93	0,69	0,00	NA	0,00	0,30	0,00	0,00	0,77	0,23	0,63	0,12	0,55	0,31	0,05	0,13	<i>OF_Wand</i>
0,39	0,98	0,81	NA	0,00	0,01	0,80	0,00	0,00	0,56	0,28	0,79	0,06	0,70	0,38	0,03	0,08	<i>OF_Zent</i>
0,90	0,64	NA	0,81	0,69	0,41	0,30	0,01	0,06	0,18	0,02	0,30	0,96	0,14	0,84	0,23	0,31	<i>Irw</i>
0,24	NA	0,64	0,98	0,93	0,63	0,00	0,32	0,53	0,30	0,68	0,05	0,80	0,23	0,74	0,20	0,17	<i>Temp</i>
NA	0,24	0,90	0,39	0,47	0,96	0,24	0,75	0,40	0,96	0,58	0,17	0,01	0,38	0,03	0,42	0,01	<i>FCM</i>

Korrelationsanalyse nach Spearman (*Gria1*-Modell, späte Adoleszenz): *r*-Werte.

	FCM	Temp	IrW	OF_Zent	OF_Wand	OF_Sp ränge	OF_Re ering	OF_Im mobil	OF_Dist	Heimk_Zent	Heimk_Trä	Heimk_Futt	Heimk_Vel	Heimk_Dist	VWR	Nest	BUR_Du_2	BUR_Du_1	BUR_Hell_2	BUR_Hell_1	Sp	r-Wert
0,2	-0,36	0,07	-0,16	0,01	-0,21	-0,04	-0,17	0,09	0,25	-0,06	0,01	0,16	0,17	0,08	-0,08	-0,52	-0,15	-0,45	0	1	Sp	
0,06	-0,22	0,12	-0,17	0,13	0,13	0,13	-0,03	0,04	-0,43	0,11	-0,15	-0,43	-0,3	-0,16	-0,11	0,16	0,1	-0,18	1	0	BUR_Hell_1	
0,05	-0,13	0,03	-0,26	0,24	-0,13	0,06	0,01	0,01	-0,12	0,08	0,06	0,02	-0,03	-0,01	0,06	0,07	0,22	1	-0,18	-0,45	BUR_Hell_2	
-0,47	-0,01	-0,11	0,11	0,19	0,44	-0,26	0,58	-0,59	-0,3	-0,02	-0,6	-0,3	-0,51	0,18	0,59	0,51	1	0,22	0,1	-0,15	BUR_Du_1	
-0,5	0,25	-0,33	0,4	-0,08	0,37	-0,21	0,38	-0,33	-0,02	-0,22	-0,26	-0,15	-0,24	-0,05	0,32	1	0,51	0,07	0,16	-0,52	BUR_Du_2	
-0,46	0,44	-0,13	0,18	0	0,14	-0,29	0,8	-0,76	-0,1	-0,23	-0,71	-0,23	-0,45	0,49	1	0,32	0,59	0,06	-0,11	-0,08	Nest	
-0,03	0,15	0,25	-0,01	0	-0,1	-0,1	0,37	-0,3	-0,13	-0,32	-0,32	0,21	0,04	1	0,49	-0,05	0,18	-0,01	-0,16	0,08	VWR	
0,54	-0,17	0,38	-0,18	0,11	0,05	0,26	-0,52	0,57	0,27	-0,24	0,5	0,9	1	0,04	-0,45	-0,24	-0,51	-0,03	-0,3	0,17	Heimk_Dist	
0,41	-0,07	0,35	-0,06	0,03	-0,02	0,13	-0,28	0,32	0,25	-0,28	0,23	1	0,9	0,21	-0,23	-0,15	-0,3	0,02	-0,43	0,16	Heimk_Vel	
0,36	-0,23	0,02	-0,15	-0,04	-0,18	0,26	-0,63	0,69	0,23	0,07	1	0,23	0,5	-0,32	-0,71	-0,26	-0,6	0,06	-0,15	0,01	Heimk_Futt	
-0,12	-0,24	-0,07	-0,08	0,06	-0,13	0,16	-0,27	0,2	0,11	1	0,07	-0,28	-0,24	-0,32	-0,23	-0,22	-0,02	0,08	0,11	-0,06	Heimk_Trä	
0	-0,03	-0,09	0,18	-0,31	-0,04	-0,13	-0,2	0,2	1	0,11	0,23	0,25	0,27	-0,13	-0,1	-0,02	-0,3	-0,12	-0,43	0,25	Heimk_Zent	
0,52	-0,4	0,29	-0,35	0,3	-0,19	0,53	-0,94	1	0,2	0,2	0,69	0,32	0,57	-0,3	-0,76	-0,33	-0,59	0,01	0,04	0,09	OF_Dist	
-0,52	0,5	-0,17	0,4	-0,29	0,2	-0,52	1	-0,94	-0,2	-0,27	-0,63	-0,28	-0,52	0,37	0,8	0,38	0,58	0,01	-0,03	-0,17	OF_Immobil	
0,32	-0,12	0,19	-0,33	0,4	-0,08	1	-0,52	0,53	-0,13	0,16	0,26	0,13	0,26	-0,1	-0,29	-0,21	-0,26	0,06	0,13	-0,04	OF_Rearing	
-0,15	0,04	0,01	0,05	0,08	1	-0,08	0,2	-0,19	-0,04	-0,13	-0,18	-0,02	-0,05	-0,1	0,14	0,37	0,44	-0,13	0,13	-0,21	OF_Sprünge	
0,11	-0,29	0,17	-0,72	1	0,08	0,4	-0,29	0,3	-0,31	0,06	-0,04	0,03	0,11	0	0	-0,08	0,19	0,24	0,13	0,01	OF_Wand	
-0,29	0,36	-0,21	1	-0,72	0,05	-0,33	0,4	-0,35	0,18	-0,08	-0,15	-0,06	-0,18	-0,01	0,18	0,4	0,11	-0,26	-0,17	-0,16	OF_Zent	
0,46	-0,19	1	-0,21	0,17	0,01	0,19	-0,17	0,29	-0,09	-0,07	0,02	0,35	0,38	0,25	-0,13	-0,33	-0,11	0,03	0,12	0,07	IrW	
-0,21	1	-0,19	0,36	-0,29	0,04	-0,12	0,5	-0,4	-0,03	-0,24	-0,23	-0,07	-0,17	0,15	0,44	0,25	-0,01	-0,13	-0,22	-0,36	Temp	
1	-0,21	0,46	-0,29	0,11	-0,15	0,32	-0,52	0,52	0	-0,12	0,36	0,41	0,54	-0,03	-0,46	-0,5	-0,47	0,05	0,06	0,2	FCM	

Korrelationsanalyse nach Spearman (*Gria1*-Modell, späte Adoleszenz): *p*-Werte.

FCM	Temp	IrW	OF_Zent	OF_Wand	OF_Sprün	OF_Rearin	OF_Im mobil	OF_Dist	Heimk_Zent	Heimk_Trä	Heimk_Futt	Heimk_Vel	Heimk_Dist	VWR	Nest	BUR_Du_1	BUR_Du_2	BUR_Heil_1	BUR_Heil_2	Sp	p-Wert
0,22	0,03	0,65	0,34	0,96	0,20	0,82	0,31	0,57	0,14	0,70	0,94	0,35	0,32	0,63	0,65	0,00	0,35	0,00	0,98	NA	Sp
0,72	0,19	0,49	0,30	0,43	0,43	0,45	0,85	0,81	0,01	0,52	0,35	0,01	0,07	0,35	0,50	0,34	0,53	0,29	NA	0,98	BUR_Heil_1
0,75	0,44	0,84	0,12	0,15	0,45	0,71	0,96	0,97	0,46	0,64	0,73	0,91	0,88	0,93	0,72	0,69	0,19	NA	0,29	0,00	BUR_Heil_2
0,00	0,93	0,51	0,50	0,24	0,01	0,12	0,00	0,00	0,06	0,90	0,00	0,06	0,00	0,27	0,00	0,00	NA	0,19	0,53	0,35	BUR_Du_1
0,00	0,12	0,04	0,01	0,63	0,02	0,21	0,02	0,04	0,88	0,18	0,12	0,36	0,14	0,75	0,05	NA	0,00	0,69	0,34	0,00	BUR_Du_2
0,00	0,01	0,42	0,28	0,99	0,41	0,08	0,00	0,00	0,56	0,16	0,00	0,17	0,00	NA	NA	0,05	0,00	0,72	0,50	0,65	Nest
0,85	0,38	0,14	0,95	0,98	0,56	0,57	0,02	0,07	0,45	0,05	0,05	0,20	0,82	NA	0,00	0,75	0,27	0,93	0,35	0,63	VWR
0,00	0,30	0,02	0,28	0,51	0,77	0,12	0,00	0,00	0,11	0,15	0,00	0,00	NA	0,82	0,00	0,14	0,00	0,88	0,07	0,32	Heimk_Dist
0,01	0,68	0,03	0,72	0,86	0,89	0,44	0,09	0,05	0,14	0,09	0,17	NA	0,00	0,20	0,17	0,36	0,06	0,91	0,01	0,35	Heimk_Vel
0,03	0,17	0,90	0,38	0,79	0,28	0,12	0,00	0,00	0,16	0,68	NA	0,17	0,00	0,05	0,00	0,12	0,00	0,73	0,35	0,94	Heimk_Futt
0,49	0,14	0,68	0,64	0,74	0,43	0,33	0,10	0,22	0,52	NA	0,68	0,09	0,15	0,05	0,16	0,18	0,90	0,64	0,52	0,70	Heimk_Trä
0,98	0,88	0,59	0,29	0,06	0,80	0,45	0,22	0,23	NA	0,52	0,16	0,14	0,11	0,45	0,56	0,88	0,06	0,46	0,01	0,14	Heimk_Zent
0,00	0,01	0,08	0,03	0,07	0,26	0,00	0,00	NA	0,23	0,22	0,00	0,05	0,00	0,07	0,00	0,04	0,00	0,97	0,81	0,57	OF_Dist
0,00	0,00	0,30	0,01	0,08	0,23	0,00	NA	0,00	0,22	0,10	0,00	0,09	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,96	0,85	0,31	OF_Immobil
0,05	0,48	0,27	0,04	0,01	0,64	NA	0,00	0,00	0,45	0,33	0,12	0,44	0,12	0,57	0,08	0,21	0,12	0,71	0,45	0,82	OF_Rearin
0,37	0,83	0,96	0,77	0,61	NA	0,64	0,23	0,26	0,80	0,43	0,28	0,89	0,77	0,56	0,41	0,02	0,01	0,45	0,43	0,20	OF_Sprünge
0,50	0,08	0,31	0,00	NA	0,61	0,01	0,08	0,07	0,06	0,74	0,79	0,86	0,51	0,98	0,99	0,63	0,24	0,15	0,43	0,96	OF_Wand
0,08	0,03	0,22	NA	0,00	0,77	0,04	0,01	0,03	0,29	0,64	0,38	0,72	0,28	0,95	0,28	0,01	0,50	0,12	0,30	0,34	OF_Zent
0,00	0,25	NA	0,22	0,31	0,96	0,27	0,30	0,08	0,59	0,68	0,90	0,03	0,02	0,14	0,42	0,04	0,51	0,84	0,49	0,65	IrW
0,21	NA	0,25	0,03	0,08	0,83	0,48	0,00	0,01	0,88	0,14	0,17	0,68	0,30	0,38	0,01	0,12	0,93	0,44	0,19	0,03	Temp
NA	0,21	0,00	0,08	0,50	0,37	0,05	0,00	0,00	0,98	0,49	0,03	0,01	0,00	0,85	0,00	0,00	0,75	0,72	0,22	0,22	FCM

7. R-Skripte

ART-ANOVA

```
rm(list=ls())

# download and install the ARTool package

install.packages("devtools")

devtools::install_github("mjskay/ARTool")

# call the library

library(ARTool)

# set working directory

setwd("")

# load the data

df <- read.csv(".csv")

## show the basic structure of data, data will be displayed below

str(df)

head(df, n=100)

## define m and transform the data by function art

m <- art(Y ~ factor(X1) * factor(X2), data=df)

## Display the output to check

summary(m)

## Please check: the columns sums of aligned responses and the F values should

## all be ~0, indicating that the alignment correctly "stripped out"

## effects not of interest.

## Thus, we can apply the ANOVA on the transformed data.

anova(m)
```

```
## In case interaction p<.05, perform "interaction contrasts"

library(phia)

library(dplyr)

library(tidyr)

## Run an ART ANOVA and define m

m = art(Y ~ factor(X1)*factor(X2), data = df)

anova(m)

## Conduct pairwise comparison within a main factor

library(deplyr) # for %>% pipe

art.con(m, "X1:X2", adjust="") %>% # run ART-C for X1 x X2
  summary() %>%

# Spearman-Korrelationsanalyse

rm(list=ls())

library("corrplot")

library("Hmisc")

setwd("")

#Daten Einlesen

C1 <- read.csv(".csv", sep=';', dec="," ,check.names = F)

#wählt nur die Daten ohne Tiernummer oder experimentelle Gruppe aus

rownames(C1) <- C1$ID

all_C1 <- C1[,3:NCOL(C1)]

#Korrelationsanalyse

cor <- Hmisc::rcorr(as.matrix(all_C1), type="spearman")

cormat <- round(cor$r,2)

#Schreiben der P und R Werte
```

```
write.csv2(round(cor$r,2), ".csv")

write.csv2(cor$P, ".csv")

#Auswahl der Zeilen

cormat <- cormat[1:16, 1:16]

###Heatmap der Correlationsmatrix###

corrplot(cormat, method="color", tl.col="black", tl.cex=0.2, cl.cex = 0.2,
type="upper")

#Speichern der Korrelationsmatrix als PDF

pdf(file=".pdf", width=215, height=130)

# PCA

rm(list=ls())

setwd("")

set_B16 <- read.csv2("", fileEncoding = "Latin1", check.names = F)

#read the data set

testset <- set_B16

testset2 <- set_B16

names(testset)

#select the parameter, which should be used for the PCA

library(dplyr)

testset <- testset %>% select(-(animal_id:treatment))

#PCA

PCA_data <- prcomp(testset, center = TRUE, scale = TRUE)

#creates a new dataframe to plot the results

PCA_result <- bind_cols(testset2$animal_id, testset2$treatment, testset2$mod,
PCA_data$x)

PCA_result <- rename(PCA_result, animal_id = ...1, treatment = ...2, mod = ...3)

#summary for the PCA

summary(PCA_data)

#calculating the variance (unnecessary see above)
```



```
eig <- (PCA_data$sdev)^2
variance <- eig*100/sum(eig)
cumvar <- cumsum(variance)
PCA_result$treatment <- as.factor(PCA_result$treatment)
PCA_result$treatment = factor(PCA_result$treatment,
                              levels = c("", "
#Plot PCA with treatment and mod
windows(width=28, height=20)
library(ggplot2)
PCA_result %>%
  ggplot(aes(PC1, PC2))+
  theme_bw()+
  stat_ellipse(aes(fill=treatment, colour=treatment),geom = "polygon", alpha =
0.1)+
  geom_point(aes(colour = treatment),size = 3)+
  xlab("PC1 ( %)")+
  ylab("PC2 ( %)")+
  theme(text = element_text(size = 20), legend.text = element_text(size=20))+
  labs (pch = "")+
  scale_colour_manual(name="", labels =c("", ""), values = c("", ""))+
  scale_fill_manual(name="", labels =c("", ""), values = c("", "d"))

#identify top parameters for PC1 and PC2
BiocManager::install("made4")
library("made4")
library("caret")
library("ggfortify")
library("factoextra")
library("caret")
# set working directory
setwd("")
# load data
d <- read.csv2(".csv", header=T)
```

```
# save data again for later under a new name
d2 <- d
# check the data
str(d)
# save group naming to be used in PCA
groups <- d[, "Group"]
# select numeric data only
d <- d[, 3:NCOL(d)]
}
# Run the PCA on scaled and centered data
pre.proc <- preProcess(d, method=c("center", "scale"))
d <- predict(pre.proc, d)
# use the "ord" function to run the PCA
# save the results in "d_ord" which is an object with all PCA results
d_ord <- ord((d), type="pca")
# create temporary data frame with the loadings of the PCA
temp <- sqrt((d_ord$ord$co[, 1:2])^2)
# sort the loadings according to PC1
temp <- temp[order(temp[, 1], decreasing = T),]
# show the top 5
temp[1:5,]
# sort the loadings according to PC2
temp <- temp[order(temp[, 2], decreasing = T),]
# show the top 5
temp[1:5,]
# show the percentage of variance explained
# non-cumulative over the first five PCs
(d_ord$ord$eig * 100/sum(d_ord$ord$eig))[1:5]
```

X. PUBLIKATIONSLISTE

Teile dieser Arbeit wurden in den nachfolgenden Publikationen veröffentlicht:

- 1. Development of behavioral patterns in young C57BL/6J mice: a home cage-based study.**

Reiber M, Koska I, Pace C, Schönhoff K, von Schumann L, Palme R, Potschka H. Scientific Reports 2022 Feb; 12(1):2550.

- 2. Behavioral phenotyping of young Scn1a haploinsufficient mice.**

Reiber M, Miljanovic N, Schönhoff K, Palme R, Potschka H. Epilepsy & Behavior 2022 Nov; 136:108903.

- 3. Phenotyping young GluA1 deficient mice – a behavioral characterization in a genetic loss-of-function model.**

Reiber M, Stirling H, Sprengel R, Gass P, Palme R, Potschka H. Frontiers in Behavioral Neuroscience 2022 Jun; 16:877094.

Weitere Publikation:

Molecular alterations of the TLR4-signaling cascade in canine epilepsy.

von Rüden EL, Gualtieri F, Schönhoff K, **Reiber M**, Wolf F, Baumgärtner W, Hansmann F, Tipold A, Potschka H. BMC veterinary research 2020 Jan;16(1):18.

XI. DANKSAGUNG

Mein Dank geht an erster Stelle an meine Doktormutter Prof. Dr. Heidrun Potschka für die Übertragung dieses spannenden Projekts und das in mich gesetzte Vertrauen. Für meine Ausbildung und die intensive Betreuung, die Eröffnung vieler neuer Perspektiven und die auch über den Rahmen dieses Dissertationsprojekts hinausgehende Förderung möchte ich mich ganz herzlich bedanken! Ferner möchte ich mich für die Chance, an meinen Aufgaben zu wachsen, vielmals bedanken sowie dafür, dass ich mich in diesem wichtigen und intensiven Lebensabschnitt sowohl wissenschaftlich und beruflich als auch persönlich weiterentwickelt habe.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Eva-Lotta von Rüden Ph.D., Nina Miljanovic Ph.D., Dr. Claudia Pace, Dr. Ines Koska, Dr. Katharina Schönhoff und Dr. Isabel Seiffert vielmals für die Einführung in die Methodiken und die inspirierenden Diskussionen bedanken. PD Rolf Sprengel Ph.D. danke ich herzlich für die Betreuung im Zusammenhang mit dem GluA1-Projekt. PD Rolf Sprengel Ph.D., Prof. Dr. Rupert Palme und Prof. Dr. Peter Gass danke ich vielmals für ihre fachliche Hilfe und die gute Zusammenarbeit im Rahmen unseres DFG-FOR2591-Verbunds.

Mein Dank geht ferner an Sabine Vican für ihre großartige Unterstützung beim Zuchtmanagement, die umsichtige und liebevolle Pflege der Tiere und die exzellente technische Unterstützung! Des Weiteren danke ich Sarah Glisic, Helen Stirling, Claudia Siegl, Lara von Schumann, Uwe Roßberg, Katharina Gabriel, Andreas Kutschka und Sieglinde Fischlein vielmals für die exzellente technische Unterstützung. Bei Lara von Schumann möchte ich mich zudem für ihre fachliche Unterstützung beim Erstellen der R-Skripte bedanken. Pepin Marshall und Helen Stirling danke ich vielmals für die Language-Revision. Dem gesamten Team der AG Potschka und AG Ammer danke ich für die schöne gemeinsame Zeit.

Ich bin dankbar für die fachliche und finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG-FOR2591 (PO681/9-2 und GA427/12-2).

Meiner Familie und meinen Freundinnen, im Besonderen Michaela und Silke, danke ich herzlich für den warmherzigen Support, mit dem Ihr mir das Anfertigen dieser Arbeit ermöglicht habt.