GEFÖRDERT VOM
Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

S C H L U S S B E R I C H T

AgroClustEr PHÄNOMICS – Ein systembiologischer Ansatz zur Genotyp-Phänotyp-Abbildung im Kontext von Leistung, Gesundheit und Wohlbefinden bei den Nutztieren Rind und Schwein (Teilprojekte TP2.4, TP3.2, TP4.2, TP4.4, TP5.5)

Förderkennzeichen: 0315536A

Zuwendungsempfänger: Universität Rostock, 18051 Rostock

Ausführende Stelle: Universität Rostock - Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Justus-von-Liebig-Weg 6, 18059 Rostock

Teilprojektleitung: Prof. Dr. E. Mohr (TP2.4, TP5.5)
Prof. Dr. Dr. h. c. M. Schwerin (TP3.2, TP4.2)
Prof. Dr. Annette Zeyner (TP4.4)

Projektlaufzeit: 01.12.2009 bis 31.12.2015

„Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315536A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegen bei den Autoren.“

Inhaltsverzeichnis

0 Berichtsblatt 4

1 Kurze Darstellung 5
1.1 Aufgabenstellung 5
1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde 5
1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens 6
1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn 7
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 7

2 Eingehende Darstellung 8
2.1 Untersuchungsansatz 8
2.2 Erzielte Ergebnisse 10
2.2.1 Individuelle Verhaltensmuster (TP2.4) 10
2.2.2 ‚OMICS'-Phänotypen - Biosignaturen des Verhaltens (TP3.2) 11
2.2.3 Validierung prognostischer Biosignaturen beim Rind (TP4.2) 18
2.2.4 Biosignaturen und Fütterungseinflüsse (TP4.4) 26
2.2.5 Validierung der ‚Multi-Criteria-Analyse' (TP5.5) 43

3 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 64

4 Veröffentlichungen -Übersicht- 65
4.1 Erfolgte bzw. im Druck befindliche Veröffentlichungen 65
4.2 Zur Publikation eingereichte Veröffentlichungen 66
4.3 Veröffentlichungen in Vorbereitung 66

5 Anlagen 67

5.2 Manuskripte bisheriger Veröffentlichungen (Auswahl) 33

Brand, B. et al. (2015): Temperament type specific metabolite profiles of the prefrontal cortex and serum in cattle. PLOS ONE 2015, DOI: 10: e0125044

Friedrich, J. et al. (2015): Genetics of cattle temperament and its impact on livestock production and breeding- a review. Arch. Anim. Breed., 58, 13-21

Graunke, K. L. et al. (2013): Describing Temperament in an Ungulate: A Multidimensional Approach. PlosOne, e74579

Graunke, K. L. et al. (2013): Objectively measuring behaviour traits in an automated restraint-test for ungulates: towards making temperament measurable. J. Agricult. Sci. 151, 141-149.

Friedrich, J. et al. (2015): Detection of genetic variants affecting cattle behaviour and their impact on milk production – a genome-wide association study. Animal Genetics 2015 DOI: 10.1111/age.12371.

Bodo Brand, Markus O. Scheinhardt, Juliane Friedrich, Daisy Zimmer, Norbert Reinsch, Siriluck Ponsuksili, Andreas Ziegler, Manfred Schwerin, Adrenal cortex expression quantitative trait loci in a Holstein Fresian X Charolaise cross. BMC Genomics

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN -	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht – ohne vertrauliche Angaben
3. Titel AgroClustEr PHÄNOMICS – Ein systembiologischer Ansatz zur Genotyp-Phänotyp-Abbildung im Kontext von Leistung, Gesundheit und Wohlbefinden bei den Nutztieren Rind und Schwein (Teilprojekte TP2.4, TP3.2, TP4.2, TP4.4, TP5.5)	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Prof. Dr. Mohr, Elmar Prof. Dr. Dr. h. c. Schwerin, Manfred Prof. Dr. Zeyner, Annette	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2015 6. Veröffentlichungsdatum Mai 2016 7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock Justus-von-Liebig-Weg 6 18059 Rostock	9. Ber. Nr. Durchführende Institution - 10. Förderkennzeichen O315536A 11. Seitenzahl 66
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 25 14. Tabellen 21 15. Abbildungen 32
16. Zusätzliche Angaben Der Bericht ist verfügbar im Internet unter www.uni-rostock.de.	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -	
18. Kurzfassung Diese Initiative hat die dauerhafte Etablierung eines Forschungsnetzes der Nutztierwissenschaften an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock in engem Verbund mit weiteren 17 außeruniversitären und universitären Partnern zum Ziel. Es werden im Nutzerkontext exzellente Kompetenzen der funktionellen Genomanalyse, der Tierzucht- und Veterinärwissenschaften, der Haustiergenetik, der Verhaltensbiologie, der Tierhaltung, der Bioinformatik und Biomathematik mit dem Ziel zusammengeführt das systembiologische Verständnis biologischer Funktionen (z.B. Verknüpfung verhaltensbiologischer und genomanalytischer Erkenntnisse) zu verbessern, neue biologisch hochaufgelöste Phänotypen zu generieren und repräsentative Indikatoren des Wohlbefindens abzuleiten. Das zentrale Ergebnis des AgroClustErs PHÄNOMICS ist die erfolgreiche Generierung von Biosignaturen des Wohlbefindens auf der Basis von Verhaltens-, Leistungs-, sowie physiologischen und molekularen Phänotypen bei Rind und Schwein. Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Verhaltenstests, von soziometrischen Beobachtungen bzw. von bioakustischen, kognitiven und emotionalen Elementen der Verhaltensreaktivität konnten bei beiden Tierarten Kognition und Emotion erfolgreich miteinander verknüpft werden. Affektive Reaktionen und Wohlbefinden konnten in Hinsicht der emotional-relevanten Dimensionen ‚Arousal' und ‚Valenz' mittels der Messungen ihrer autonomen Balance unter einem kognitiven Verhaltensparadigma erfolgreich analysiert werden. Im Ergebnis der ‚omics'-Hochdurchsatzanalysen wurden darüber hinaus molekulare Phänotypen (SNPs, mRNA-, Protein- und Metabolitenprofile) identifiziert und validiert, die geeignet sind, als prädikative Biosignaturen Aussagen über das Wohlbefinden von Tieren zu gewinnen. Die Assoziation der Verhaltens- mit den Leistungsmerkmalen konnten analysiert und Empfehlungen für die Nutzung der neuen, biologisch hoch aufgelösten Phänotypen/Biosignaturen (i) zur Entwicklung von neuen Selektions- und Anpaarungsstrategien (z.B. verbesserte Modelle zur genomischen Zuchtwertschätzung) sowie (ii) zur Entwicklung von Expertensystemen zur Bewertung der Tiergerechtheit und zur Optimierung der Haltungsverfahren bei Rind und Schwein abgeleitet werden.	
19. Schlagwörter Wohlbefinden, Biomarker, Omics-Technologien, Rind, Schwein	
20. Verlag ohne, Eigenveröffentlichung: Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock	21. Preis kostenlos

1. Kurze Darstellung

1.1 Aufgabenstellung

Die Nutztiere stellen eine unverzichtbare Ressource für die langfristige bedarfsgerechte Erzeugung hochwertiger Lebensmittel dar. Die weltweit wachsende Bevölkerung, der zunehmende Wohlstand in den Schwellenländern und die Änderung der Verzehrsgewohnheiten werden die Nachfrage nach Produkten tierischer Herkunft weiter steigern.

Die zukünftige Erzeugung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs wird zwingend die Tiergesundheit als maßgebliches Leitbild der tierischen Produktion erfordern, wobei Tiergesundheit und Wohlbefinden das Bindeglied der notwendigen Verknüpfung von Tierschutz und gesundheitlichen Verbraucherschutz darstellen. Hierbei ist zu erwarten, dass sich die europäische und nationale Gesetzgebung dem Anliegen nach Vermeidung von Schmerzen und Leiden sowie der Verbesserung des Wohlbefindens in einer verhaltensgerechten Unterbringung – über die bisherigen Regelungen in der Tierhaltung hinaus – weiter öffnen werden. Als wichtige Einflussgröße auf Verbraucherakzeptanz und Wettbewerbsfähigkeit wird dies den Handlungsdruck auf die Tierhalter verschärfen und bedarf deshalb einer begleitenden, multidisziplinären Forschung.

Das bessere Verständnis der Merkmalsausprägung stellt die entscheidende Voraussetzung für hohe Leistungen, Gesundheit und Wohlbefinden der Tiere unter den jeweiligen Produktionsbedingungen dar. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Merkmalsausprägung beim landwirtschaftlichen Nutztier stellt deshalb eine wichtige Zukunftsaufgabe der Nutztierforschung dar und ist eine wesentliche Voraussetzung für die tiergerechte, ressourcen- und umweltschonende Erzeugung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs.

Mit den sich in einer rasanten Entwicklung befindlichen ‚OMICS'-Technologien stehen Hochdurchsatzverfahren zur Verfügung, die in Hinsicht auf die Generierung hochaufgelöster Phänotypen qualitativ völlig neue Möglichkeiten für die Nutztierforschung eröffnen, diese aber auch vor neue Herausforderungen stellen werden.

Hier setzt das nutztierspezifische Kompetenznetz PHÄNOMICS an. Es werden im Nutzerkontext exzellente Kompetenzen der funktionellen Genomanalyse, der Tierzucht- und Veterinärwissenschaften, der Haustiergenetik, der Verhaltensbiologie, der Tierhaltung, der Bioinformatik und Biomathematik im Rahmen eines systembiologischen Ansatzes zur Modellierung und Nutzung der Merkmalsausprägung im Kontext von Leistung, Gesundheit und Wohlbefinden bei den Tierarten Rind und Schwein zusammengeführt.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Diese Initiative hatte die **dauerhafte Etablierung eines Forschungsnetzes** der Nutztierwissenschaften an der AUF in engem Verbund mit exzellenten außeruniversitären regionalen Partnern, dem Ressortforschungsinstitut des BMELV FLI Insel Riems und dem Leibniz-Institut FBN Dummerstorf zum Ziel. Dieser Verbund repräsentierte die größte nationale Ressource auf den Forschungsfeldern Tiergesundheit und Wohlbefinden. Verstärkt wurde dieses Netzwerk durch exzellente Arbeitsgruppen der Veterinärmedizin und funktionellen Genomics (LMU München, RFW Bonn), der Nutztierhaltung (JLU Göttingen, CAU Kiel), der Haustiergenetik und Tierzucht (CAU Kiel) und der Bioinformatik (LMU München, Universität Lübeck). Diese Vernetzung sicherte in hohem Maße die notwendige **kritische Masse**. Durch die nationale Vernetzung technologischer **‚OMICS'-Ressourcen** konnte in diesem kostenintensivem Forschungsbereich ein international vergleichbares technologisches Niveau geschaffen werden. Dies bildete auch die wesentliche Voraussetzung für die Qualifizierung des

wissenschaftlichen Nachwuchses. Das Forschungsprofil der einzelnen Partner sicherte neben der kritischen Masse die notwendige fachliche Breite als auch die konsequente transdisziplinäre Ausrichtung des Kompetenznetzes. Alle wissenschaftlichen Fragen wurden im **Nutzerkontext** bearbeitet. Durch die Einbindung des VIT als Rechenzentrums der Wirtschaft und der deutschen Schweine- und Rinderzuchtunternehmen wurde von Beginn an der Bezug zur wirtschaftlichen Praxis sichergestellt. Die **Vernetzung** von Forschergruppen der Grundlagen- und der angewandten Forschung, die Integration von Erkenntnissen und Entwicklungen aus dem Human- und Modelltierbereich sowie die Verknüpfung von funktioneller Genomics, Verhaltensforschung und Bioinformatik stellten wesentliche Voraussetzungen für die erfolgreiche Bearbeitung des innovativen Ansatzes zur systembiologischen Modellierung der Genotyp-Phänotyp-Abbildung bei den Nutztieren Rind und Schwein dar.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Durch die integrierte Anwendung von ‚OMICS'-Technologien (Genom, Transkriptom, Proteom, Metabolom) zur quantitativen genomweiten Messung von Genprodukten auf allen Ebenen der Genexpression (s. Abbildung 1) zusammen mit neu entwickelten bioinformatischen Ansätzen konnten das systembiologische Verständnis biologischer Funktionen (z.B. Verknüpfung verhaltensbiologischer und genomanalytischer Erkenntnisse) verbessert und neue biologisch hochaufgelöste Phänotypen generiert werden. Durch ‚OMICS'-Messungen an bekannten Phänotypen wurden relevante Netzwerke genomischer Faktoren sowie Gen-, Protein- und Metabolit-Konzentrationen auf verschiedenen Ebenen abgeleitet (molekularer Phänotyp) und dadurch spezifische Merkmale mit den molekularen Parametern vernetzt.

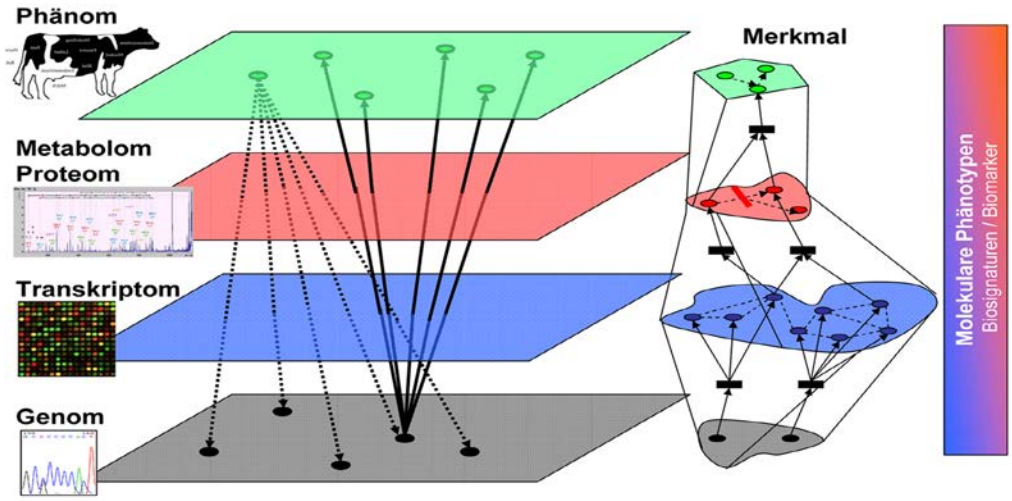


Abbildung 1: Die Ebenen der Merkmalsausprägung - Identifizierung der molekularen Phänotypen, Biosignaturen und Biomarker

Dieser experimentelle Ansatz zielte letztlich auf die Generierung genauer geschätzte Phänotypen der funktionalen Merkmale bzw. auf repräsentative Indikatoren des Wohlbefindens. Zusammen mit den modernen Verfahren der Tierzüchtung bilden die biologisch hochaufgelösten Phänotypen die wesentliche Voraussetzung für die weitere züchterische Verbesserung der Leistungsmerkmale unserer Nutztiere im Kontext von Gesundheit und Wohlbefinden.

Im Einzelnen verfolgte des Kompetenznetz PHÄNOMICS folgende inhaltliche Ziele:

- Phänotypisierung des Verhaltens: Generierung wissenschaftlich begründeter und reproduzierbar zu messender Parameter des Wohlbefindens bei Rind und Schwein,
- Optimierung parallelisierter Hochdurchsatzverfahren zur Generierung komplexer ‚OMICS'-Datensätze zur Ableitung neuer molekularer Phänotypen,
- Systembiologische Modellierung der Genotyp-Phänotyp-Abbildung ausgewählter komplexer Produktions-, Funktions- und Verhaltensmerkmale bei Rind und Schwein,
- Entwicklung prognostischer Biosignaturen für ausgewählte Produktionsmerkmale bei Rind und Schwein im Kontext von Gesundheit und Wohlbefinden,
- Validierung der neuen Phänotypen/Biosignaturen in kommerziellen Herden und unter verschiedenen endo- und exogenen Bedingungen (Rasse, Haltung, Futter, Infektion),
- Implementierung der neuen Phänotypen in Anpaarungs- und Zuchtprogrammen bzw. in Haltungsverfahren als wichtige Voraussetzung für eine nachhaltige effiziente und tiergerechte Erzeugung von Lebensmitteln tierischer Herkunft.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn

Mit dem AgroClustER „PHÄNOMICS" wurden international erstmalig die im Bereich der Nutztierhaltung strategisch bedeutsamen Felder Genomics–Verhaltensforschung–Haltung–Zucht mit dem Ziel der Genotyp-Phänotyp-Abbildung im Kontext von Leistung, Gesundheit und Wohlbefinden synergistisch vernetzt.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Entsprechend der Vorhabenbeschreibung erfolgte eine intensive Zusammenarbeit mit allen Projektpartnern, dem Wissenschaftlichen Beirat, dem Lenkungsausschuss sowie dem PtJ. Darüber hinaus erfolgte ein kontinuierlicher Informationsaustausch mit den Koordinatoren des AgroClustErs „Synbreed" und eine gegenseitige Beteiligung an Weiterbildungsveranstaltungen (Workshops, Kurse, Summer/Winter School).

2. Eingehende Darstellung

2.1 Untersuchungsansatz

Die in einem Langzeitansatz etablierte F2-Kreuzungspopulationen der Rassen Holstein und Charolais beim Rind (SEGFAM-Ressourcenpopulation) stellte ein hoch informatives Tiermodell für die Untersuchungen bei der Tierart Rind dar und bot auf Grund der großen Variabilität der betrachteten Milchleistungs- und Verhaltensmerkmale in der F2-SEGFAM-Population (s.a. Abbildung 2) bei einheitlichem genetischen Hintergrund eine sehr günstige experimentelle Voraussetzung die genetischen bzw. physiologischen Ursachen einer differenten Merkmalsausprägung bzw. eine mögliche molekulare Verbindung zwischen diesen Merkmalen aufzuklären.

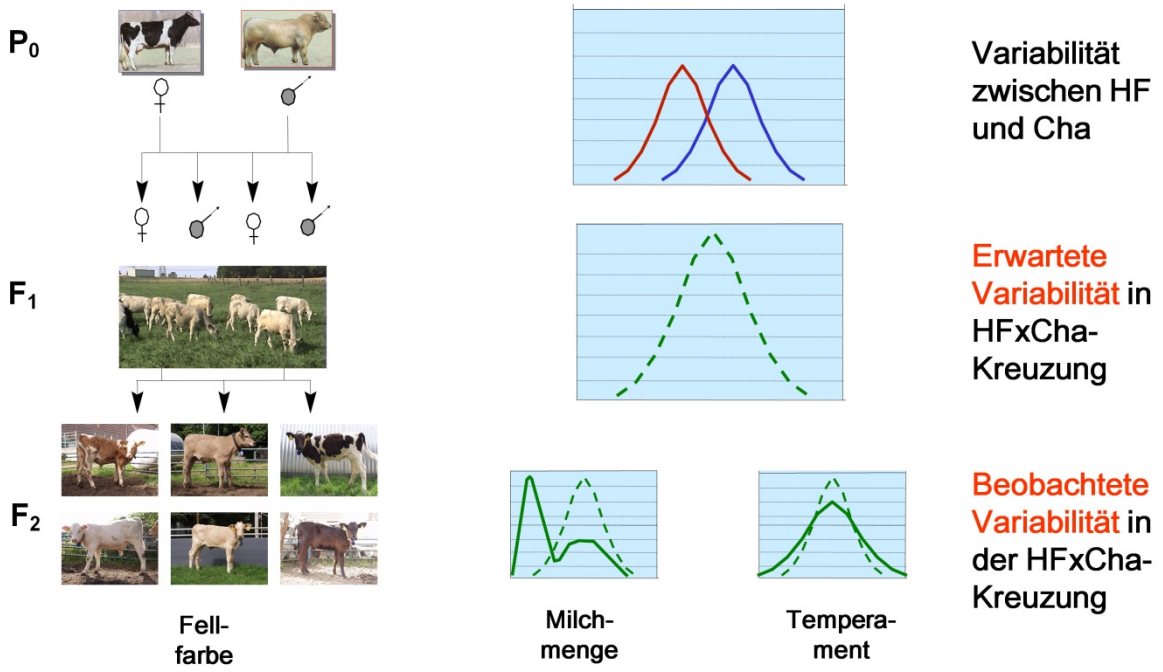


Abbildung 2: Die SEGFAM-Ressourcenpopulation - F2-Kreuzungspopulationen der Milchrindrasse Holstein und Fleischrindrasse Charolais.

Die Untersuchungen bei der Nutztierart Schwein erfolgten an einem seit 1998 als Tiermodell am FBN Dummerstorf in einem geschlossenen System gehaltenen Nukleuszucht der Deutschen Landrasse. Als Basiszuchtbetrieb ist das FBN dem Hybridschweinezuchtverband Nord Ost angeschlossen und aktiv an der Landeszucht beteiligt. Für Versuche können im 3-Wochen-Rhythmus kontinuierlich Reinzuchtnachkommen bereitgestellt werden.

Inhaltlich wurde der Forschungsverbund in folgende Themengebiete strukturiert, die sich synergistisch ergänzen und im Rahmen von fünf thematischen Verbundprojekten (VP1 – VP5) bearbeitet:

- die Entwicklung eines ‚Animal Trait Ontology'-Ansatzes – die strukturierte Interspezies-Merkmals- und Genomdatenbank im Kontext von Leistung - Gesundheit - Wohlbefinden,
- die Quantifizierung und das Monitoring von Wohlbefinden bei Rind und Schwein,
- die Generierung neuer molekularer Phänotypen durch Integration der ‚OMICS'-Datensätze,
- die systembiologische Modellierung der Genotyp-Phänotyp-Abbildung im Kontext von Leis-tung - Gesundheit - Wohlbefinden bei Rind und Schwein,
- die Validierung der neuen Phänotypen/Biosignaturen unter diversifizierenden ‚inneren' (genetischer Hintergrund) und ‚äußeren' Bedingungen (Fütterung, Infektion),

- die Implementierung der neuen Phänotypen in Marker-unterstützte Anpaarungs- und Selektionsprogramme bzw. in die Optimierung von Haltungsverfahren bei Rind und Schwein.

In der Abbildung 3 sind das Zusammenwirken der themenbasierten Projekte, die Verbindung zur Nutztierpraxis und die Einbeziehung der weltweit verfügbaren Informationen dargestellt.

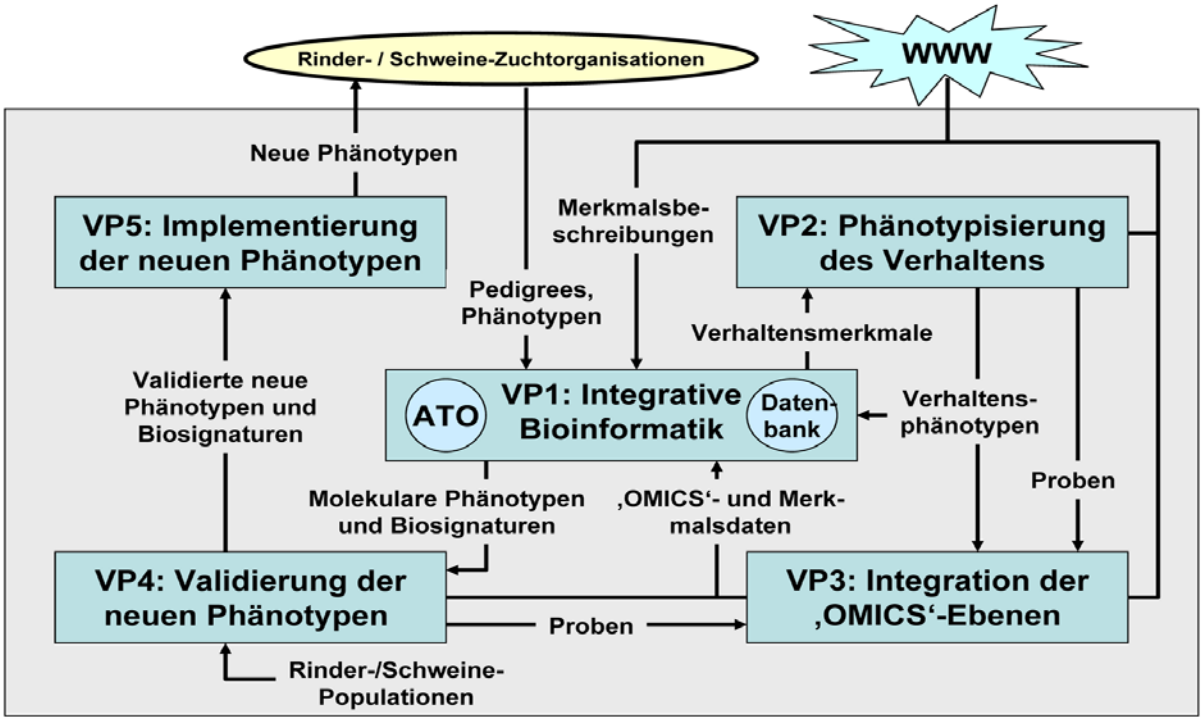


Abbildung 3: Die inhaltliche Struktur und Vernetzung der Verbundprojekte (VP) des AgroClustErs PHÄNOMICS

Das Ziel dieses Kompetenznetzes bestand darin, auf der Grundlage des integrativen Zusammenwirkens dieser Projekte ein Zentrum für Nutztierphänomics zu bilden, um die theoretischen und technologischen Grundlagen für eine verbesserte, d.h. biologisch hochauflösende Phänotypisierung der landwirtschaftlichen Nutztiere im Kontext von Leistung, Gesundheit und Wohlbefinden zu entwickeln und für die Bearbeitung der geplanten Forschungsvorhaben bereitzustellen. Im Zentrum dieses Netzes stand das Verbundprojekt VP1 „Integrative Bioinformatik", das über die wissenschaftliche Bearbeitung der systembiologischen Modellierung der Genotyp-Phänotyp-Abbildung hinaus allen anderen Projekten eine ‚Animal Trait Ontology' (ATO)-Plattform zum Komplex Wohlbefinden und eine zentrale Datenbank zum effizienten Datenaustausch zur Verfügung stellte. Das in VP2 und VP3 generierte Expertenwissen (Merkmalsbeschreibungen) stellte eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung der ATO dar. Ein terminlich fixierter Austausch von Erkenntnissen und Substraten zwischen den Projekten sicherte nicht nur eine effiziente gemeinsame Nutzung der generierten biologischen Ressourcen, sondern auch eine komplexe Merkmalserfassung. Durch VP2 und VP3 wurden in den Experimentalherden ‚OMICS'- und Merkmalsdaten gemessen, welche die Datengrundlage für die durch VP1 durchgeführte Ableitung der Biosignaturen bildeten, die durch VP4 in kommerziellen Rinder- und Schweineherden validiert wurden und in die im VP5 entwickelten Modelle zur Marker-gestützten Selektion bzw. in die Expertensysteme zur Bewertung der Tiergerechtheit von Haltungssystemen eingingen. Darüber hinaus wurden die im VP1 zusammen mit VP2 und VP3 generierten und in VP4 validierten biologisch hochaufgelösten Phänotypen (Verhaltens- und molekulare Phänotypen) über VP5 den Rinder- und Schweinezuchtunternehmen zur Verfügung gestellt.

2.2 Erzielte Ergebnisse

2.2.1 Individuelle Verhaltensmuster (TP2.4)

Die Ziele des Teilprojekts bestanden in

- der Etablierung physiologischer Parameter zur Charakterisierung des autonomen Nervensystems beim Rind,
- der Temperamentsbeschreibung beim Rind unter Verwendung von Verhaltensparametern und
- der ethologischen und physiologischen Charakterisierung individueller Reaktionsmuster.

Als eine Grundvoraussetzung für die Untersuchungen wurde die Entwicklung und Evaluierung standardisierter Verhaltenstests zur Erfassung temperaments-assoziierter Verhaltensmerkmale beim Rind unter Stallbedingungen realisiert. Dazu zählten ein kombinierter *open-field* und *novel-object* Test. Darüber hinaus wurden das Verhalten und die Herzfrequenz von 361 F2-Kreuzungskälbern (Charolais x Holstein Frisian) und 20 Reinzuchttieren jeder Ausgangsrasse in beiden Tests erfasst. Mittels eines angepassten statistischen Verfahrens der Faktoranalyse an die Datenstruktur wurden die Verhaltensdaten aus dem *open-field/novel-object* Test analysiert. Mit diesem Verfahren wurden zwei Hauptfaktoren zur Beschreibung der Reaktionsnorm der Kälber erarbeitet. Dabei wurden in beiden Verhaltenstests dieselben Hauptfaktoren mit relevanten ‚loadings' für identische Verhaltensparameter als wesentlich zur Beschreibung der Reaktionsnorm identifiziert. Insgesamt ließen sich so vier unterschiedliche Reaktionsnormen voneinander abgrenzen. Nach Verrechnung mit den Herzfrequenzdaten (HR/HRV) ergab sich, dass, unabhängig vom Geschlecht der Tiere, zwei dieser Normen parasympathisch und zwei sympathisch dominiert sind. Die vier ethophysiologisch charakterisierten Reaktionsnormen wurden in Anlehnung an aktuelle Konzepte aus der Literatur gelabelt. Die mittleren Scores von 361 Kälbern in den beiden Hauptfaktoren im ‚novel-object'-Test, die aus den in der Faktoranalyse generierten loadings errechnet wurden sind in der Abbildung 4 dargestellt.

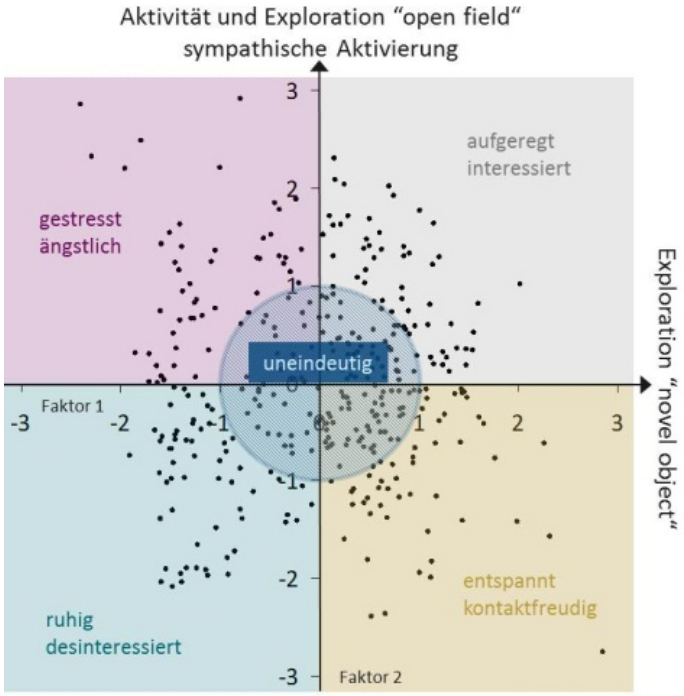


Abbildung 4: Mittlere Scores von Kälbern (n=361) in den beiden Hauptfaktoren (‚*novel-object*'-Test) und die vier resultierenden Reaktionsnormen.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Verhaltenstests, von soziometrischen Beobachtungen bzw. von bioakustischen, kognitiven und emotionalen Elementen der Verhaltensreaktivität konnten ‚Kognition' und ‚Emotion' erfolgreich miteinander verknüpft werden. Affektive Reaktionen und Wohlbefinden konnten in Hinsicht der emotional-relevanten Dimensionen ‚Arousal' (‚Erregungszustand') und ‚Valenz' (‚emotionale Bewertung') mittels der Messungen ihrer autonomen Balance unter einem kognitiven Verhaltensparadigma erfolgreich analysiert werden. Die vier resultierenden Reaktionsnormen korrelieren mit Parametern der Herzfrequenzvariabilität ($p = 0{,}029$ bis $p < 0{,}001$) und beschreiben eine vorwiegend sympathische bzw. parasympathische Aktivierung. Diese Ergebnisse sind unabhängig vom Geschlecht der Tiere. Auf Grundlage dieser Ergebnisse erfolgte die Auswahl repräsentativer Tiere der vier Reaktions-/Temperamentstypen für tiefergehende ‚OMICS'-Analysen verschiedener Organe bzw. Gewebe (s. Kapitel 2.2.2).

Die Berechnung der Scores für die jeweils 20 Reinzuchttiere der beiden Ausgangsrassen, die nach dem gleichen Testprotokoll am 90. und wiederholt am 180. Lebenstag getestet wurden, erfolgte auf der Basis der für die Kreuzungstiere berechneten ‚loadings'. Darüber hinaus wurde ein automatisierter Zugtest zur objektiven Beschreibung des Duldungs- bzw. Fluchtverhaltens entwickelt. Zur Evaluierung dieser Methode wurde ein multivariater Testdatensatz von 24 Kälbern mit zwei verschiedenen statistischen Methoden (Funktion „kcca" und Funktion „hclust"; R version 2.12.1) analysiert. Beide Analysen ergaben identische, klar voneinander getrennte Cluster, die jeweils dieselben Individuen umfassten. Tiere in Cluster 1 zeigten in allen Parametern des Fluchtverhaltens ein kontinuierlich höheres Reaktionsniveau als Tiere in Clusters 2 (Abbildung 5). Die Cluster waren unabhängig von Gewicht und Geschlecht der Tiere. Die Ergebnisse zeigten, dass mit dieser neuentwickelten Methode Unterschiede im Muster des Fluchtverhaltens von Kälbern erkannt werden können.

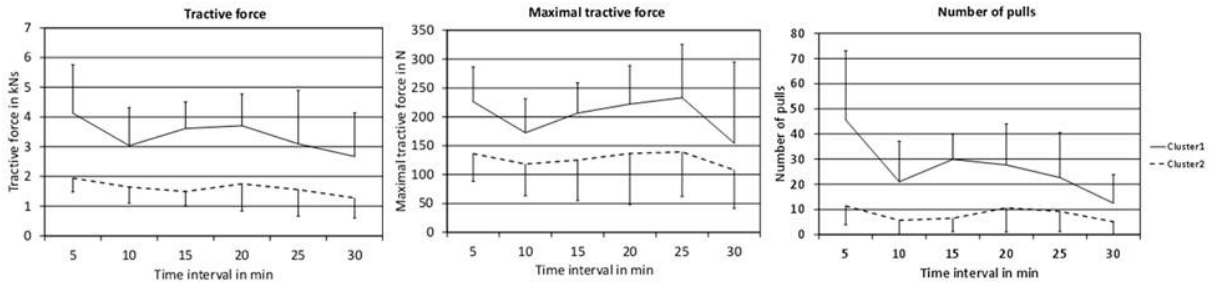


Abbildung 5: Reaktion von 24 Kälbern in einem automatisierten Zugtest in den Kenngrößen Zugkraft, maximale Zugkraft und Anzahl Zugereignisse über 30 min. Zwei unterschiedliche Reaktionsmuster, unabhängig von Geschlecht und Gewicht der Tiere, konnten beschrieben werden.

2.2.2 ‚OMICS'-Phänotypen - Biosignaturen des Verhaltens (TP3.2)

Grundsätzlich wurden in diesem Teilprojekt folgende zwei Ziele verfolgt:

- der Ausbau einer integrierten Technologieplattform zur systematischen und komplexen Erfassung und Interpretation der verschiedenen „OMICS"-Ebenen als neue molekulare Phänotypen und
- experimentelle Untersuchungen zur Generierung molekularer Phänotypen/Biosignaturen und systembiologische Modellierung der Genotyp-Phänotyp-Abbildung im Kontext von Milchleistung und Verhalten beim Rind.

Mit der Neubeschaffung des Next Generation Sequencers (Fa. Illumina) und der SNP-Array-Plattform (Fa. Illumina) im Rahmen von PHÄNOMICS sowie des Laser-Capture Microdissection Zeiss-Palm

Systems und der Microarray-Plattform der Fa. Agilent aus Institutshaushaltsmitteln konnte die ‚omics'-Plattform am Standort (AUF/FBN) wie geplant ausgebaut werden.

Die wissenschaftlichen Zielstellungen dieses Teilprojektes waren:

- Erfassung von Milchleistungs- und Verhaltensmerkmale bei den Founder- und F2-Kühen des Dummerstorfer SEGFAM-Rinderfamilienpanels,
- Analyse der Genexpression auf verschiedenen ‚OMICS'-Ebenen der Founder- und F2-Kühe des Dummerstorfer SEGFAM-Rinderfamilienpanels,
- Generierung komplexer ‚OMICS'-Phänotypen (Transkripte, Proteine, Metaboliten),
- Kartierung exprimierter merkmalsbeeinflussender Loci (eQTL) unter Einbeziehung genomweit erfasster SNP-Genotypen, Transkript-, Protein-, Metaboliten-Daten und komplexer ‚OMICS'-Phänotypen/Genomweite Assoziationsanalyse,
- Identifizierung und Definierung von mit Milchleistungs- und Verhaltensmerkmalen signifikant assoziierten Biosignaturen (‚OMICS'-Phänotypen).

Von insgesamt 160 milchleistungs- und verhaltensgetesteten Kühen der F2-SEGFAM-Ressourcenpopulation wurden nach deren Schlachtung Proben von für die genannten Leistungsmerkmale relevanten Zielgeweben (Nebennierenrinde, Leber, Euter, Amygdala, Hippocampus, Hypothalamus, präfontaler Cortex) gewonnen, die entsprechenden biologischen Substrate (DNA, RNA, Proteine, Metaboliten) isoliert, mittels SNP-Chips genotypisiert und mittels parallelisierter Hochdurchsatzverfahren ein Expressionsprofiling auf Transkriptom-, Proteom- bzw. Metabolom-Ebene durchgeführt. Von 126 Kühen lagen komplette Datensätze vor. Im Alter von 90 Tagen wurden diese Kühe drei Verhaltenstests ausgesetzt: dem ‚Open field'-Test (OF), dem ‚Novel object'-Test (NO) und dem ‚Novel human'-Test (NH). Jeder dieser Tests dauerte 10 min. Während der Verhaltenstests wurden die Dauer, die Frequenz und die Latenz verschiedener Verhaltensmerkmale, wie Aktivität, Inaktivität, Exploration und Kontakt gemessen. Als Milchleistung wurden folgende Leistungsmerkmale der 1. Laktation einbezogen: mittlere Milchmenge je Laktationstag, Milchmenge Tag 1 – Tag 5 der Laktation, Milchmenge Tag 6 – Tag 30 der Laktation, Ratio Milchmenge ein Tag vor und nach einer Umstallung des Tieres, Ratio Milchmenge 3 Tage vor und nach Umstallung des Tieres In der Tabelle 1 sind die Pearson`s Korrelationskoeffizienten zwischen der erfassten Milchleistungs- und Verhaltensphänotypen dargestellt. Während die erfassten Milchleistungs- bzw. Verhaltensphänotypen untereinander hoch korrelieren, weisen die erfassten Milchleistungs- nur geringe Korrelation mit den Verhaltensmerkmalen auf.

Tabelle 1: Pearson`s Korrelationskoeffizienten zwischen der erfassten Milchleistungs- und Verhaltensphänotypen

	DI OF	DA OF	DE OF	DI NO	DA NO	DE NO	MY	Y5	Y30	R1	R3
DI OF		-0,67**	-0,75**	0,42**	-0,42**	-0,27*	0,08	0,09	0,08	0,03	-0,02
DA OF			0,10	-0,40**	0,48**	0,18	-0,02	-0,08	-0,01	-0,10	-0,07
DE OF				-0,24*	0,16	0,24*	-0,08	-0,05	-0,08	0,01	0,06
DI NO					-0,84**	-0,82**	0,13	0,16	0,15	-0,10	-0,07
DA NO						0,45**	0,00	-0,06	-0,05	0,02	0,02
DE NO							-0,24*	-0,21*	-0,22*	0,15	0,09
MY								0,75**	0,93**	-0,38**	-0,49**
Y5									0,82**	-0,29*	-0,29*
Y30										-0,45**	-0,56**
R1											0,76**
R3											

DI, Dauer Inaktivität; DA, Dauer Aktivität; DE, Dauer Erkundung; OF, Open-field-Test, NO, Novel object-Test; MY, Mittlere Milchmenge je Laktationstag; Y5, Milchmenge Tag 1 – Tag 5; Y30, Milchmenge Tag 6 – Tag 30; R1, Ratio Milchmenge ein Tag vor und nach Umstallung; R3, Ratio Milchmenge 3 Tage vor und nach Umstallung

* $P < 0,05$

** $P < 0,001$

Mittels einer genomweiten Assoziationsstudie wurden genetische Marker mit signifikantem Einfluss auf Verhaltensmerkmale beim Rind identifiziert. Für die Genotypisierung mittels Illumina Bovine SNP50 BeadChip wurde DNA genutzt, die aus dem nach der Schlachtung (30 Tage post partum der 2. Laktation) erhaltenen Eutergewebe isoliert wurde. Bei jeder der 126 Proben wurden mindestens 98 % der SNPs auf dem Chip erfolgreich gescannt. Aus der anschließenden Qualitätskontrolle, bei der SNP-Cluster, die hinsichtlich bestimmter Parameter auffällig waren, neu editiert oder ausgeschlossen wurden, resultierten 37.204 SNPs, die in die Assoziationsanalyse einbezogen wurden. Diese SNPs wiesen eine minimale Allelefrequenz (MAF) von mindestens 0.05 und eine Genotypisierungsrate von mindestens 90 % auf. Die Assoziationsanalyse erfolgte mit dem Arbeitspacket „SNP-Trait Association" des Programms JMP® Genomics (SAS). Dabei wurden sowohl die Frequenz als auch die Dauer der verschiedenen Verhaltensweisen betrachtet. Das genutzte statistische Modell wurde an den jeweiligen Merkmalstyp angepasst, so wurden für die kontinuierlich verteilten Daten (Dauer) ein gemischtes lineares Modell (MIX) verwendet und für die Frequenzen ein generalisiertes gemischtes lineares Modell (GLIMMIXED). Für die Dauer der Aktivität und Inaktivität wurden zudem noch Gewichtsmerkmale (Geburtsgewicht, durchschnittliche tägliche Zunahme bis zum Testtag) als zufällige Effekte definiert, da in einer multiplen Regressionsanalyse ein signifikanter Einfluss der genannten Parameter auf diese Verhaltensmerkmale festgestellt wurde. Um die Anzahl falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren, wurde die Bonferroni-Korrektur für ein Signifikanzniveau von $p = 0{,}05$ für jeden Test angewandt. In der Abbildung 6 sind die genom-weiten Plots für die Merkmale Aktivitäts- und Inaktivitäts-Dauer während des OF-Tests und die Häufigkeit der Kontakte während des NO-Tests dargestellt.

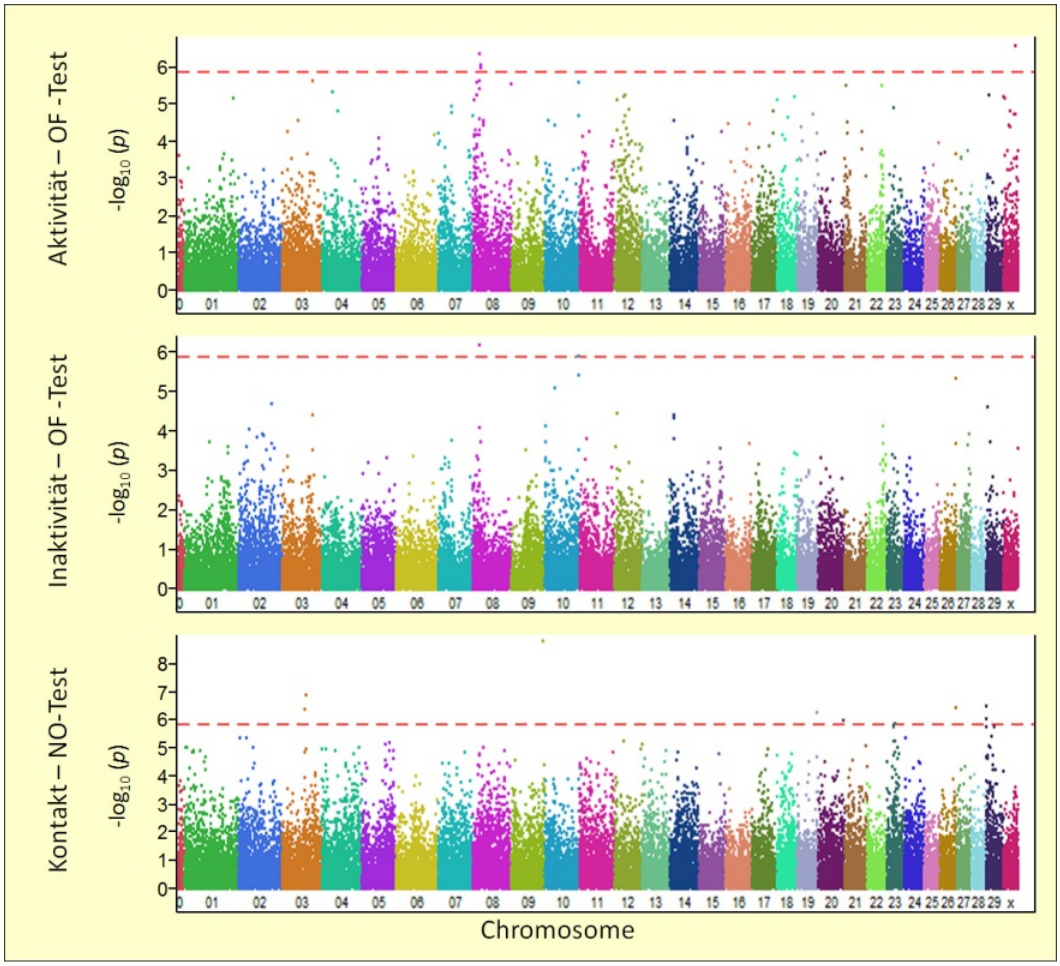


Abbildung 6: Genom-weite Plots der –log10(p-Werte) von SNPs, die mit der Aktivitäts- und Inaktivitäts-Dauer während des OF-Tests oder der Kontakthäufigkeit während des NO-Tests assoziiert sind (Rote gestrichelte Linien: 5 % Type 1 Fehler nach Bonferroni-Korrektur).

Tabelle 2 'Single nucleotide polymorphism' (SNPs) mit signifikanten Effekten (P < 0,05) auf Verhaltensmerkmale

SNP name	Chr	Position (bp)	Trait	P-value	Gene	SNP effect
		‚Open-field test'				
ARS-BFGL-NGS-12099	2	62447051	DI	6,09 x 10^{-7}**		-47,28
BTB-00121590	2	69774359	DI	1,35 x 10^{-5}*		-71,39
Hapmap53343-ss46526328	6	69184582	DE	2,05 x 10^{-6}*	*OCIAD2*	-31,59
ARS-BFGL-NGS-53616	8	98532984	DA	2,95 x 10^{-6}*		-29,90
ARS-BFGL-NGS-33270	10	9339256	DI	1,27 x 10^{-5}*		42,73
ARS-BFGL-NGS-84397	14	8984849	DI	2,21 x 10^{-6}*	*ST3GAL1*	44,41
Hapmap35693-SCAFFOLD203067_5292	19	38157880	DI	2,94 x 10^{-5}*	*IGF2BP*	-67,91
BTA-12468-no-rs	21	9375095	DA	8,61 x 10^{-6}*	*LOC782362*	-26,79
ARS-BFGL-NGS-1111	21	9888915	DA	3,73 x 10^{-5}*		31,58
ARS-BFGL-NGS-98658	22	52113096	DI	3,70 x 10^{-5}*	*LOC101904056*	-35,55
ARS-BFGL-NGS-2942	22	52827405	DI	2,81 x 10^{-5}*	*PTPN23*	-41,25
Hapmap36051-SCAFFOLD127864_2139	24	920520	DI	1,93 x 10^{-5}*		44,39
Hapmap47669-BTA-59022	24	1094942	DI	1,55 x 10^{-5}*	*NFATC1*	42,13
ARS-BFGL-NGS-64563	24	21649461	DA	8,82 x 10^{-5}*		-31,36
		‚Novel object test'				
ARS-BFGL-NGS-79494	2	62890977	DI	5,65 x 10^{-7}**	*TMEM163*	-51,34
BTA-122016-no-rs	3	38811314	DE	1,24 x 10^{-5}*		-26,61
Hapmap59011-rs29027498	4	26490406	DE	1,28 x 10^{-5}*		-29,35
Hapmap35118-BES3_Contig414_932	7	112133700	DA	1,24 x 10^{-5}*	*TMEM232*	35,34
ARS-BFGL-NGS-27299	9	85002515	DE	1,81 x 10^{-5}*	*LOC781799*	27,90
ARS-BFGL-NGS-69908	9	94683820	DE	2,26 x 10^{-5}*		27,81
ARS-BFGL-NGS-38535	10	20008636	DA	6,41 x 10^{-6}*	*HCN4*	-56,55
ARS-BFGL-BAC-13522	10	46312239	DE	1,96 x 10^{-6}*		-62,16
ARS-BFGL-NGS-3030	10	46548679	DE	1,37 x 10^{-6}*	*USP3*	-66,28
ARS-BFGL-NGS-76427	10	46665928	DI	2,86 x 10^{-5}*		76,95
			DE	9,35 x 10^{-6}*		-44,28
Hapmap31150-BTA-152385	10	66687859	DE	9,99 x 10^{-7}**		41,45
Hapmap48681-BTA-19661	12	33721124	DI	1,08 x 10^{-5}*	*ATP8A2*	46,36
ARS-BFGL-BAC-17008	14	44941560	DI	3,28 x 10^{-6}*		-47,60
			DE	1,48 x 10^{-6}*		24,64
ARS-BFGL-NGS-33213	14	68599010	DI	1,56 x 10^{-5}*	*MATN2*	-47,57

UA-IFASA-7753	14	71025573	DI	2,72 x 10^{-5}*		58,25
ARS-BFGL-NGS-40602	15	53250782	DE	2,67 x 10^{-5}*	*FCHSD2*	- 54,52
ARS-BFGL-NGS-28402	16	50798300	DE	1,88 x 10^{-5}*	*MEGF6*	- 29,61
ARS-BFGL-NGS-11665	19	17597495	DE	1,08 x 10^{-5}*		35,78
Hapmap38959-BTA-44727	19	21950487	DE	3,21 x 10^{-5}*		- 31,93
ARS-BFGL-NGS-105622	19	22157176	DI	2,52 x 10^{-7}**		74,43
ARS-BFGL-NGS-42699	25	10305794	DA	3,00 x 10^{-5}*	*LITAF*	- 44,32
ARS-BFGL-NGS-1312	26	48583446	DI	7,97 x 10^{-6}*		- 61,62
			DA	3,44 x 10^{-5}*		31,32
BTB-00981789	28	24751304	DA	2,94 x 10^{-5}*	*MYPN*	- 30,57
ARS-BFGL-NGS-3441	29	19234709	DE	4,27 x 10^{-5}*	*LOC524642*	- 33,50
ARS-BFGL-NGS-47918	29	19332326	DE	4,27 x 10^{-5}*		- 33,50
ARS-BFGL-NGS-78952	29	19376416	DE	4,27 x 10^{-5}*		- 33,50
Hapmap59851-rs29025765	X	15953283	DA	8,18 x 10^{-5}*		- 35,62

DI, Dauer Inaktivität; DA, Dauer Aktivität; DE, Dauer Erkundung
*, 'significant chromosome-wide'; **, 'significant genome-wide'

Definierte Chromosomenregionen (SNPs) beeinflussen die Verhaltensparameter Dauer der Aktivität und Inaktivität sowie die Häufigkeit von Kontakten signifikant. Es wurden 41 signifikante SNPs, verteilt über 10 Chromosomen, identifiziert, die mit der Dauer von Aktivität, Inaktivität oder dem Explorationsverhalten während der Verhaltenstests assoziiert waren (s.a. Tabelle 2). Auffällig ist, dass die in den verschiedenen Verhaltenstests erfassten Verhaltensmerkmale jeweils von unterschiedlichen Regionen im Genom beeinflusst werden.

Die einzige Ausnahme bildet die im OF-Test erfasste Dauer der Aktivität und Inaktivität, bei der auf BTA8 für beide Merkmale signifikante SNPs gefunden wurden. Auch unterscheiden sich die mit SNPs signifikant assoziierten Verhaltensmerkmale zwischen den Verhaltenstests. Während nur ein Marker im OF-Test für das Explorationsverhalten auf Chromosom 6 signifikant war konnten im NO-Test 16 Marker identifiziert werden, die mit dem Explorationsverhalten assoziiert waren, von denen keiner auf Chromosom 6 lag.

Darüber hinaus weisen erste Untersuchungen auf die teilweise Kopplung der Verhaltens- und Milchleistungsmerkmal-beeinflussenden Genomregionen (s. Tabelle 3) hin, obwohl der weitaus größte Anteil der die Verhaltensparameter beeinflussenden Genorte (22 von 41) keine Assoziation mit Milchleistungsmerkmalen aufweist. In Abbildung 7 sind die Genotypen-Effekte eines signifikant mit Verhaltensmerkmalen assoziierten BTA14-SNPs auf Verhaltens- und Milchleistungsmerkmale exemplarisch dargestellt.

Tabelle 3 ‚Least Squares Means' ± Standardfehler (LSM ± S.E.) der Genotypen von ‚Single nucleotide polymorphisms' (SNPs) mit gleichzeitig signifikanten Effekten auf Verhaltens- (‚novel object test') und Milchleistungsmerkmale

SNP Name	**Chr**	**Merk-mal**	**Genotype**					
			0[1]		**1[2]**		**2[3]**	
			n	**LSM ± S.E.**	**n**	**LSM ± S.E.**	**n**	**LSM ± S.E.**
Hapmap35118-BES3_Contig414_932	7	Y5	72	26,08 ± 1,47	72	30,85 ± 1,59*	3	2,00 ± 7,25**

		Y30		189,15 ± 15,26		194,70 ± 15,89		-16,41 ± 70,92*
		DA		103,08 ± 5,54		66,16 ± 5,53**		54,43 ± 26,79
ARS-BFGL-NGS-38535	10	Y5	130	28,22 ± 1,22	16	24,99 ± 3,30	1	12,84 ± 4,25*
		DA		75,46 ± 15,31		128,67 ± 18,98**		194,36 ± 48,02*
ARS-BFGL-BAC-17008	14	MY	56	4,28 ± 0,58	58	6,11 ± 0,55*	33	7,40 ± 0,76**
		R1		1,36 ± 0,13		1,16 ± 0,12		0,98 ± 0,15**
		DI		393,09 ± 22,08		441,23 ± 21,89*		479,49 ± 25,08**
		DE		86,26 ± 8,43		57,82 ± 8,44**		37,53 ± 10,37**
ARS-BFGL-NGS-33213	14	R1	41	1,44 ± 0,14	73	1,19 ± 0,13*	33	0,94 ± 0,16**
		R3		1,55 ± 0,20		1,36 ± 0,18		0,93 ± 0,23**
		DI		394,11 ± 13,39		418,29 ± 10,04		496,25 ± 14,92**
UA-IFASA-7753	14	Y5	76	30,95 ± 1,66	65	25,06 ± 1,59*	6	26,54 ± 5,14
		DI		441,98 ± 20,69		414,47 ± 21,50		355,10 ± 42,36*
Hapmap38959-BTA-44727	19	Y5	27	33,15 ± 3,01	101	27,79 ± 1,86	19	22,49 ± 3,32*
		DE		33,12 ± 16,00		66,98 ± 13,3**		91,71 ± 16,62**
ARS-BFGL-NGS-3441	29	Y30	90	211,79 ± 13,14	57	145,75 ± 17,49**		
		MY		6,54 ± 0,76		3,92 ± 0,82**		
		R3		1,16 ± 0,14		1,57 ± 0,16**		
		DE		51,00 ± 14,17		87,00 ± 14,61**		
ARS-BFGL-NGS-47918	29	Y30	90	211,79 ± 13,14	57	145,75 ± 17,49**		
		R3		1,16 ± 0,14		1,57 ± 0,16**		
		MY		6,54 ± 0,76		3,92 ± 0,82**		
		DE		51,00 ± 14,17		87,00 ± 14,61**		
ARS-BFGL-NGS-78952	29	R3	90	1,16 ± 0,14	57	1,57 ± 0,16**		
		MY		6,54 ± 0,76		3,92 ± 0,82**		
		Y30		211,79 ± 13,14		145,75 ± 17,49**		
		DE		51,00 ± 14,17		87,00 ± 14,61**		

DI, Dauer Inaktivität; DA, Dauer Aktivität; DE, Dauer Erkundung; MY, Mittlere Milchmenge je Laktationstag; Y5, Milchmenge Tag 1 – Tag 5; Y30, Milchmenge Tag 6 – Tag 30; R1, Ratio Milchmenge ein Tag vor und nach Umstallung; R3, Ratio Milchmenge 3 Tage vor und nach Umstallung

[1] Homozygote Majorallele

[2] Heterozygote

[3] Homozygote Minorallele

Signifikant unterschiedlich vom Genotype 0 bei P = 0,05 (*); P = 0,005 (**)

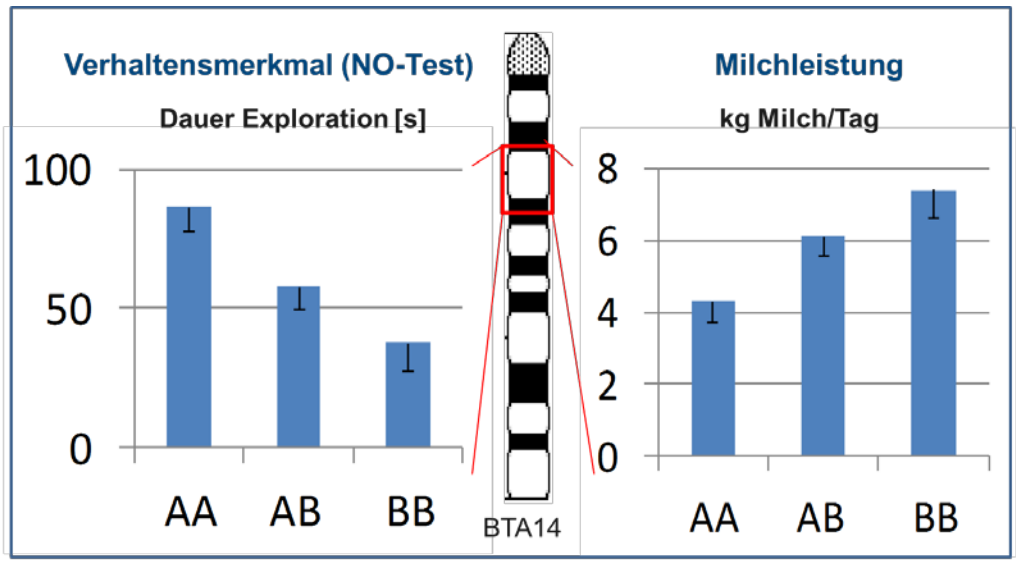
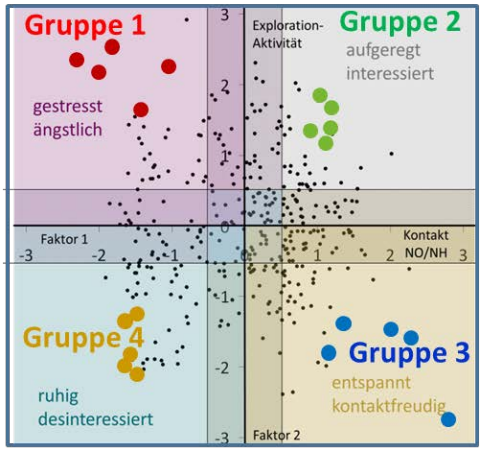


Abbildung 7: Genotyp-Effekte eines signifikant mit Verhaltensmerkmalen assoziierten BTA14-SNPs auf Verhaltens- (NO: ‚novel object'-Test) und Milchleistungsmerkmale (Mittelwert ± Standardfehler).

Abweichend vom ursprünglichen Arbeitsplan wurden unter Nutzung der neuen experimentellen Möglichkeiten durch das Versuchsschlachthaus des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie die in die ‚omics'-Untersuchungen einzubeziehenden Zielgewebe abgeändert. Da das Ziel dieser Studie darin bestand, mögliche molekulare Verbindungen zwischen Milchleistungs- und Verhaltensmerkmalen

durch die systembiologische Vernetzung der ‚omics'-Ebenen darzustellen, erschien die Einbeziehung im Versuchsschlachthaus möglich zu gewinnender zentralnervöser Organe besonders zielführend. Aus diesem Grund wurden die zwischenzeitlich entwickelten experimentellen Möglichkeiten zur Gewinnung und Analyse verhaltensrelevanter Gehirnregionen (Amygdala, Hippocampus, präfrontaler Cortex) sowie Organe der Stressachse (Hypothalamus, Nebennierenrinde) gezielt im Rahmen von PHÄNOMICS genutzt. Die entstehenden Mehrkosten wurden dadurch kompensiert, dass auf die Untersuchung der Michproben (Begrenzung auf laktierende Tiere) sowie Euterproben verzichtet wurde, das Metabolomprofiling kostengünstiger outgesourct werden konnte und die eigenen Metabolomuntersuchungen auf die Darstellung einzelner Metaboliten konzentriert wurde.

Temperamentstypen des Rindes nach ‚Novel object'- und ‚Human approach'-Test (d 90 ± 3 p.p.)



Metabolitenprofiling im präfrontalen Cortex (d 1.341 ± 98 p.p.) - Hauptkomponentenanalyse (PCA)

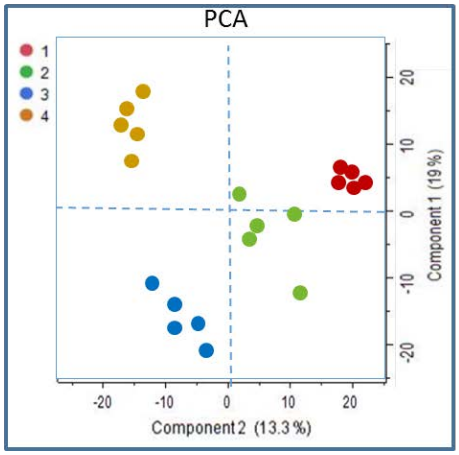


Abbildung 8: Metabolitenprofiling ausgewählter Rinder verschiedener Temperamentstypen (jeder Punkt repräsentiert ein Tier, wobei die großen farbigen Punkte die für die PCA-Analyse ausgesuchten Tiere repräsentieren).

In der Abbildung 8 ist das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse der im präfrontalen Cortex von jeweils 5 extremen Tieren von vier Temperamentstypen ermittelten Metabolitenprofile dem Ergebnis der mittels standardisierter Verhaltenstests (‚Novel object'- und ‚Human approach'-Test) durchgeführten Temperamentstypisierung gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass nach Maßgabe der Metabolitenprofile des präfrontalen Cortexes eine klare Differenzierung der verschiedenen Temperamentstypen beim Rind möglich ist.

Die Temperamentstyp-Spezifität der Metabolitenprofile scheint in der Ontogenese der Tiere unter den gewählten Versuchsbedingungen relativ stabil zu sein, da die Typisierung des Temperaments der Tiere bereits beim Kalb im Lebensalter von 90 ± 3 Tagen erfolgte, während das Metabolomprofiling zum Zeitpunkt der Schlachtung der Tiere (1.341 ± 98 Tage p.p.) durchgeführt wurde.

Der präfrontale Cortex steht für Lebenduntersuchungen am Tier nicht zur Verfügung und damit für die Ableitung prädikativer Biosignaturen. Deshalb wurde parallel zum Metabolomprofiling des präfrontalen Cortex ein Metabolomprofiling des Serums der Tiere durchgeführt, das nichtinvasiv von allen Tieren auch unter Praxisbedingungen gewonnen werden kann. Ähnlich des Metabolomprofiling im präfrontalen Cortex konnte anhand der Metabolitenprofile eine Differenzierung der Temperamentstypen durchgeführt werden. Die Annotation der in Kühen verschiedener Temperamentstype im präfrontalen Cortex bzw. im Serum exprimierten Metaboliten ergab eine Zuordnung zu überwiegend den gleichen Stoffwechselwegen (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Annotation der in Kühen verschiedener Temperamentstypen im präfrontalen Cortex bzw. im Serum exprimierten Metaboliten

Funktion	Stoffwechselweg	Präfront. Cortex		Serum	
		n Mol.	p	n Mol.	p
Molekulare und zelluläre Funktion	Biochemie kleiner Moleküle	**48**	< 0,04	**69**	< 0,04
	Molekulartransport	**47**	< 0,04	**63**	< 0,04
	Zell. Wachstum u. Proliferation	**36**	< 0,03	-	
	Zell-Zell-Interaktion	**26**	< 0,04	-	
	AS-Metabolismus	**25**	< 0,04	**28**	< 0,03
	KH-Metabolismus	-		**39**	< 0,04
	Zelltod und -überleben	-		**48**	< 0,04
Physiol. Entw. u. Fkt.	Nervensystem (Entw., Fkt.)	**21**	< 0,04	**28**	< 0,02
	Organism. Entwicklung	**20**	< 0,02	**31**	< 0,00
	Verhalten	-		**19**	< 0,04

Abweichungen vom ursprünglichen Zeitplan ergaben sich durch die Tatsache, dass die experimentellen Arbeiten zu diesem Teilprojekt erst mit 15 monatiger Verspätung begonnen werden konnten. Hauptursache dieser Verspätung war, dass erst im Juni 2011 eine genügend große Anzahl Milchleistung und Verhalten phänotypisierter und zur Schlachtung anstehender F2-SEGFAM-Kühe für die Probengewinnung zur Verfügung stand. Dabei haben sich insbesondere zwischenzeitlich in der F1-Population auftretende Fortpflanzungsprobleme (dieses unikale Tiermodell befindet sich seit 1997 im Aufbau) als auch die institutsintern beschlossene Verschiebung des Schlachttermins vom 100. auf den 30. Tag der 2. Laktation negativ ausgewirkt. Darüber hinaus konnte erst mit 3-monatiger Verzögerung eine geeignete Doktorandin für die Projektbearbeitung gewonnen werden.

Dennoch konnte das Teilprojekt im Rahmen einer kostenneutralen Verlängerung bei durch das Outsourcen eingesparten Mitteln vollinhaltlich realisiert werden. Durch die möglich gewordene Einbeziehung verhaltensrelevanter Gehirnareale in die Untersuchungen ist eine höhere Aussagefähigkeit in Hinsicht auf die Darstellung der molekulare Verbindungen zwischen Milchleistungs- und Verhaltensmerkmalen gegeben. Die Validierung der Ergebnisse im Serum ist eine wesentliche Voraussetzung von Biomarkern, die unter Praxisbedingungen gemessen werden können.

2.2.3 Validierung prognostischer Biosignaturen beim Rind (TP4.2)

Die Ziele des Teilprojekts bestanden grundsätzlich in

- Untersuchungen zur Ableitung verhaltensassoziierter Beobachtungsmerkmale bei Kühen verschiedener Rassen bzw. Kreuzungen in Weidehaltung, welche unter diesen praktischen Haltungsbedingungen ein Temperamentscoring der Tiere ermöglichen,
- Diagnose der in TP3.2 identifizierten verhaltensassoziierten Biomarker (SNPs, Serummetabolite) bei diesen Tieren und
- Untersuchung der Assoziation der in TP3.2 identifizierten verhaltensassoziierten Biomarker (SNPs, Serummetabolite) mit den unter Praxisbedingungen erfassten Phänotypen (Milchleistung, Temperamentscore).

a. Untersuchungen zur Ableitung verhaltensassoziierter Beobachtungsmerkmale bei Kühen verschiedener Rassen bzw. Kreuzungen in Weidehaltung

In Kooperation mit zwei Praxisbetrieben wurde das Verhalten von 104 Milchrind- und 135 Fleischrindfärsen auf der Weide und während einer standardisierten tierärztlichen Untersuchung erfasst. Insgesamt lagen 205 komplette Datensätze von Färsen verschiedener Rassen bzw. Kreuzungen vor, die unter Praxisbedingungen in Weidehaltung gehalten wurden (Betrieb 1: Deutsche Holstein n=85 Tiere; Betrieb 2: Fleischrindkreuzungen n=120 Tiere). Die Phänotypisierung des Verhaltens

erfolgte zum einen durch eine Habituation der Tiere im Rahmen von Vorversuchen durch Weidebegehungen nach einem festgelegten Begehungsplan. Dazu wurde jeweils über acht Wochen 32-mal eine Weidebegehung durchgeführt. Während der 21-30-minütigen Begehung nahm die begehende Person kontinuierlich die sich annähernden Tiere auf, während eine zweite Person außerhalb der Weide das Liegeverhalten protokollierte. Der Abstand der Tiere zur begehenden Person wurde in vier Kategorien eingeteilt: Kontakt, bis 0,6 m, 0,6-2,5 m, 2,5-5,0 m. Zum anderen wurden während drei aufeinanderfolgender tierärztlicher Untersuchungen 15 Verhaltensmerkmale (Temperamentscore, Ohr-, Kopf- und Halsbewegungen, Eintritts- uns Austrittsgeschwindigkeit in den/aus den Fangstand) anhand von Videoaufzeichnungen von den sich in den Weidefangständen befindenden Tieren sowie die Serumcortisolkonzentration bestimmt.

Der Weidefangstand bestand aus einem Korral zum Sammeln der Herde, einem Gang (ca. 5 m) vor dem Fangstand in welchem sich die Tiere nicht umdrehen können, dem Fangstand mit Fixiergitter für den Kopf und einem weiteren Gang (ca. 6 m, s.a. Abbildung 9).

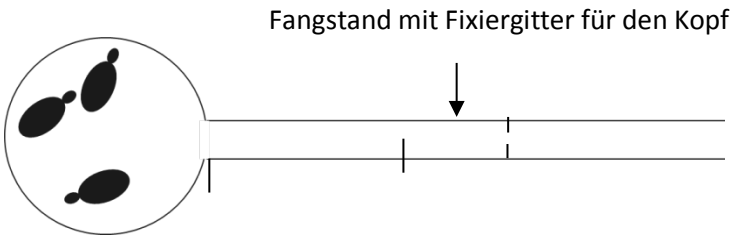


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Weidefangstandes.

Die Erfassung der Verhaltensmerkmale erfolgte einheitlich nach folgender Verfahrensweise: Im Fangstand wurde der Kopf des Tieres fixiert. Ab da begann die Zeitzählung für den Fangstand: 15 sec. keine Berührung, Tierarzt nähert sich, 15 sec. Berührung an Kopf und Hals, 15 sec. Berührung an Bauch und Rücken, 15 sec. Berührung an Hinterteil und Schwanz. Danach wurde Blutentnahme aus Schwanzvene durchgeführt und das Tier aus dem Fangstand freigelassen. Sollte sich das Tier nicht freiwillig aus Fangstand und Gang entfernt haben, durfte nach 45 sec. getrieben werden.

Mittels der Spearman-Rangkorrelationsanalyse konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Verhaltensbeobachtungsmerkmale untereinander bzw. mit der Serumcortisolkonzentration korreliert sind (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Spearman-Rangkorrelationskoeffizenten zwischen ausgewählten Verhaltens-beobachtungsmerkmalen und Serumcortisolkonzentrationen beim Rind.

Merkmal 1	Merkmal 2	Spearman-Rang-korrelation (r)	P
Eintritt [m/s]	Temperamentscore	**0,4351**	< 0,0001
Austritt [m/s]	Temperamentscore	**0,3063**	< 0,0001
	Eintritt [m/s]	**0,4477**	< 0,0001
Cortisolkonzentration [ng/ml]	Temperamentscore	**0,4463**	< 0,0001
	Eintritt [m/s]	**0,4693**	< 0,0001
	Austritt [m/s]	**0,5688**	< 0,0001

Ein Vergleich der erfassten Verhaltensbeobachtungswerte und der Serumcortisolkonzentration

zwischen dem Milchrindfärsen der Rasse Holstein und den verschiedenen Fleischrindkreuzungen ergab hoch signifikante Unterschiede (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Mittlere Verhaltensbeobachtungsmerkmale und Serumcortisolkonzentrationen bei Färsen verschiedener Rinderrassen bzw. Kreuzungen (Mittelwerte ± Standardabweichung).

Merkmal	Färsen der Rasse Holstein	Färsen verschiedener Fleischrindkreuzungen
Temperamentscore	1,69 ± 0,6396	2,52 ± 1,0542***
Eintritt [m/s]	0,69 ± 0,5304	1,46 ± 0,7519***
Austritt [m/s]	0,49 ± 0,4232	2,18 ± 0,8881***
Cortisolkonzentration [ng/ml]	31,88 ± 22,9927	87,24 ± 42,2342***

*** P < 0,0001

Darüber hinaus wurden die Beobachtungsdaten mittels eines an die Datenstruktur angepassten statistischen Verfahrens der Hauptkomponentenanalyse ausgewertet. Mit diesem Verfahren konnten zwei Hauptfaktoren (PC1 und PC2) zur Beschreibung der Reaktionsnorm der Tiere abgeleitet wurden. PC1 erklärt 33,0 % und PC2 22,6 % der Varianz der Verhaltensmerkmale. Dabei wurden in beiden Tiergruppen dieselben Hauptfaktoren mit relevanten ‚loadings' für gleiche Beobachtungsparameter als wesentlich zur Beschreibung der Reaktionsnorm identifiziert. Die mittleren Scores der 205 Tiere in den beiden Hauptfaktoren, die aus den in der Faktoranalyse generierten ‚loadings' errechnet wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle 7 für alle Beobachtungswerte dargestellt.

Insgesamt kann eingeschätzt werden, dass mittels der im Rahmen von veterinärmedizinischen Untersuchungen bei Kühen in Weidehaltung erfassten Beobachtungsmerkmale ein Scoring des Temperaments unter diesen Haltungsbedingungen möglich ist. Nach Maßgabe der unter Einbeziehung dieser Merkmale (s. Tabelle 5) ermittelten Hauptkomponenten PC1 und PC2 lassen sich zum einen die Kühe in beiden Stichproben verschiedenen Temperamentstypen zuordnen und werden zum anderen die bereits im Mittelwertvergleich beobachteten hochsignifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Rassen bzw. Kreuzungen deutlich.

Tabelle 7: ‚Loadings' der erfassten Beobachtungsparameter in den beiden Hauptfaktoren auf die die geschätzten Temperamentscores (blau: signifikanter Effekt)

Beobachtungsmerkmal	Hauptkomponente 1 (PC1)	Hauptkomponente 2 (PC2)
Geschwindigkeit des Tieres in m/s vom Eintreten in den Treibgang bis zum Schließen des Fanggitters	**0,76747**	0,09912
Geschwindigkeit des Tieres in m/s vom Öffnen des Fanggitters bis zum Verlassen des Treibgangs	**0,71614**	0,13187
Hornansatz am Kopf befindet sich unterhalb der gedachten Verlängerung der Wirbelsäule	-0,49989	-0,10948
Hornansatz am Kopf befindet sich oberhalb, während Schnauze sich unterhalb der gedachten Verlängerung der Wirbelsäule befindet; Kopf und	0,34506	0,08487

Rücken bilden damit in etwa eine Linie		
Schwanz hängt normal ohne sichtbare Anspannung herunter	**-0,75518**	0,10684
Schwanz macht schnelle, schlagende Bewegungen nach links und rechts	**0,85460**	0,03895
Wechsel zwischen den einzelnen Ohrpositionen	0,00246	-0,02098
Wechsel zwischen den einzelnen Kopfpositionen	**0,77592**	0,13866
mindestens ein Ohr locker	0,15033	-0,34216
mindestens ein Ohr nach vorne gerichtet	-0,03961	**0,88446**
mindestens ein Ohr nach hinten gerichtet	-0,17433	**-0,82448**
beide Ohren nach vorne gerichtet	0,06948	**0,87751**
beide Ohren nach hinten gerichtet	-0,14478	**-0,76206**

Ob die Ergebnisse der Verhaltenstests (s. Kapitel 2.2.1) anhand der ausgewählten Merkmale der Verhaltensbeobachtung auch Informationen über die emotional-relevanten Dimensionen ‚Arousal' (‚Erregungszustand') und ‚Valenz' (‚emotionale Bewertung') liefern muss noch weiter untersucht werden. Während die Geschwindigkeit der Tiere beim Ein- bzw. Austritt in bzw. aus dem Treibgang und die Schwanzbewegungen aufgrund der positiven Korrelation mit der Plasmacortisolkonzentration offensichtlich Hinweise auf ihren Erregungszustand (‚Arousal') erlauben, könnte die Ohrstellungen der Tiere offensichtlich eine Einschätzung der emotionalen Bewertung (‚Valenz') zulassen. Zur Validierung der im Teilprojekt TP3.2 abgeleiteten Biosignaturen (SNPs, Serummetabolitenkonzentrationen, s. Kapitel 2.2.2) wurde sich aufgrund der Unsicherheit in der Bewertung der Ohrstellung vorwiegend auf die bereits in der Literatur und hauptsächlich den Erregungszustand beschreibenden Merkmale Temperamentscore, Eintritts- und Austrittsgeschwindigkeit sowie die Plasmacortisolkonzentration konzentriert.

b. Diagnose der verhaltensassoziierten Biomarker (SNPs, Serummetabolite)

Die experimentellen Untersuchungen (Serumprobengewinnung, SNP-Chip-Analysen, Serum-Metabolomprofiling, Erfassung von Verhaltensphänotypen anhand von Videoaufzeichnungen) konnten abgeschlossen werden. Für die statistische Analysen wurden die Daten entsprechend aufbereitet (Verhalten: Test Normalverteilung ggf. Transformation (Box-Cox) und Varianzheterogenität (ANOVA mit „TU", „H", „Testtag" (fix) und „Tier" (random) sowie „Rasse" (fix); Genotypen: Filter: MAF ≥ 0,05, Number of missing genotypes ≤ 90%). Insgesamt wurden 33.904 SNPs und 356 Metabolite, von denen 159 Metabolite annotiert waren, in diesem Teilprojekt analysiert. Die genetischen Analysen wurden getrennt nach Tierarztuntersuchung und Höfen durchgeführt. Als Effekte wurden die Habituation und bei den Fleischrindern zusätzlich die Zusammensetzung der Kreuzungsrassen berücksichtigt. Von den 41 der im Teilprojekt TP3.2 identifizierten SNPs (s. Kapitel 2.2.2 Tabelle 2), die mit Verhaltensmerkmalen assoziiert waren, konnten 29 erfolgreich in der zu untersuchenden Population typisiert werden. Ein Teil (12 SNPs) der 41 SNPs wurde hauptsächlich aufgrund der MAF in der Qualitätskontrolle ausgeschlossen. Die Ergebnisse für die Merkmale Temperamentscore, Eintritts- und Austrittsgeschwindigkeit sowie der Plasmacortisolkonzentration sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: ‘Single nucleotide polymorphism’ (SNPs) mit signifikanten Effekten auf Verhaltensmerkmale in TP3.2 und TP4.2.

Hof	TU	Merkmal	p-value	SNP Name	Chromosom
K	3	austritt	0.0193	ARS-BFGL-NGS-2942	22
K	1	austritt	0.0233	ARS-BFGL-BAC-17008	14
P	2	austritt	0.0469	ARS-BFGL-NGS-40602	15
K	1	austritt	0.0317	ARS-BFGL-NGS-105622	19
K	3	austritt	0.00405	ARS-BFGL-NGS-105622	19
P	1	austritt	0.044	ARS-BFGL-NGS-42699	25
P	2	austritt	0.0354	ARS-BFGL-NGS-42699	25
K	2	austritt	0.006	BTB-00981789	28
P	1	austritt	0.0436	ARS-BFGL-NGS-3441	29
P	2	austritt	0.0403	ARS-BFGL-NGS-3441	29
P	3	austritt	0.0147	ARS-BFGL-NGS-3441	29
P	1	austritt	0.0436	ARS-BFGL-NGS-47918	29
P	2	austritt	0.0403	ARS-BFGL-NGS-47918	29
P	3	austritt	0.0147	ARS-BFGL-NGS-47918	29
P	1	austritt	0.0436	ARS-BFGL-NGS-78952	29
P	3	austritt	0.0147	ARS-BFGL-NGS-78952	29
P	2	Cortisol	0.0403	ARS-BFGL-NGS-84397	14
K	3	Cortisol	0.0369	ARS-BFGL-NGS-1111	21
P	2	Cortisol	0.0194	BTA-122016-no-rs	3
K	1	Cortisol	0.00151	ARS-BFGL-NGS-33213	14
P	1	Cortisol	0.0493	ARS-BFGL-NGS-33213	14
K	2	Cortisol	0.0268	UA-IFASA-7753	14
K	3	Cortisol	0.0454	UA-IFASA-7753	14
K	2	Cortisol	0.0468	ARS-BFGL-NGS-40602	15
P	1	Cortisol	0.0118	ARS-BFGL-NGS-42699	25
P	1	Cortisol	0.00955	ARS-BFGL-NGS-3441	29
P	1	Cortisol	0.00955	ARS-BFGL-NGS-47918	29
P	1	Cortisol	0.00955	ARS-BFGL-NGS-78952	29
K	2	eintritt	0.0215	ARS-BFGL-NGS-79494	2
K	1	eintritt	0.0121	ARS-BFGL-NGS-33213	14
K	3	eintritt	0.0138	UA-IFASA-7753	14
K	2	eintritt	0.0468	ARS-BFGL-NGS-40602	15
K	2	eintritt	0.0276	ARS-BFGL-NGS-42699	25
K	3	eintritt	0.0378	ARS-BFGL-NGS-42699	25
K	1	eintritt	0.0407	ARS-BFGL-NGS-47918	29
K	1	eintritt	0.0407	ARS-BFGL-NGS-78952	29
P	1	score	0.013	ARS-BFGL-NGS-53616	8
P	2	score	0.0142	ARS-BFGL-NGS-53616	8
K	2	score	0.0357	BTA-12468-no-rs	21
P	1	score	0.033	ARS-BFGL-NGS-28402	16
K	3	score	0.0408	ARS-BFGL-NGS-42699	25

Hof: K = Fleischrinder, P = Milchrinder; TU = Tierärztliche Untersuchung

Insgesamt konnten für 14 der insgesamt 29 in TP3.2 identifizierten SNPs eine Assoziation mit einem Verhaltensmerkmal in einer der drei Tierarztuntersuchungen nachgewiesen werden. Auffallend sind dabei SNPs auf Chromosom 14 und 29 die entweder mit mehr als einem Verhaltensmerkmal assoziiert waren oder über mehrere Untersuchungen hinweg eine Assoziation mit einem bestimmten Verhaltensmerkmal zeigten.

Um Habituation als Faktor zu berücksichtigen, wurden die Metabolomuntersuchungen während der zweiten tierärztlichen Untersuchung nach der Habituation durchgeführt. Die Hauptkomponentenanalyse der Metabolomdaten visualisiert 32,5 % (20,7 % + 11,8 %) der gesamten Variation (s. Abbildung 10). Es gibt ein klares Clustering der Proben nach den Rassen bzw. Kreuzungen (Pet: Holsteins; Klock: Fleischrindkreuzungen), während für die Reaktions- bzw. Temperamentstypen oder die Habituation der Tiere (1: ohne Habituation; 2: mit Habituation) weniger ein Clustering, denn ein hohe Variabilität deutlich wird.

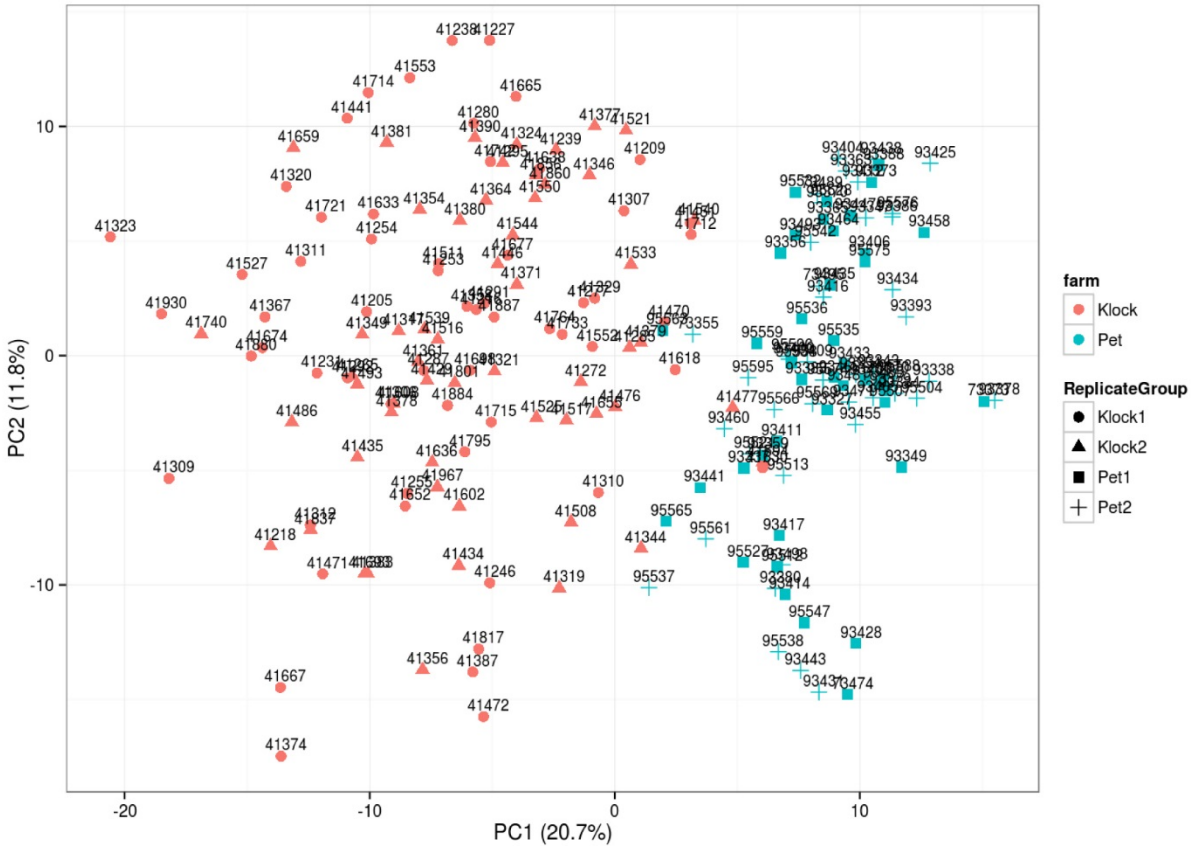


Abbildung 10: Hauptkomponentenanalyse der Serummetabolitenkonzentrationen der Milch- (blau) und Fleischrind-Färsen (rot) ohne (Punkte, Quadrate) und mit Habituation (Dreiecke, Pluszeichen).

Die in der Abbildung 11 dargestellte ‚Heatmap' zeigt alle Metabolite und ihre relative Abundanz in den Rassen- bzw. Kreuzungsgruppen mit und ohne Habituation. Obwohl in der Hauptkomponentenanalyse die Habituationseinflüsse nicht unterschieden werden konnte, weist die ‚Heatmap' und differentielle Analyse auch auf Unterschiede zwischen den ‚Subgruppen' hin.

HF FR

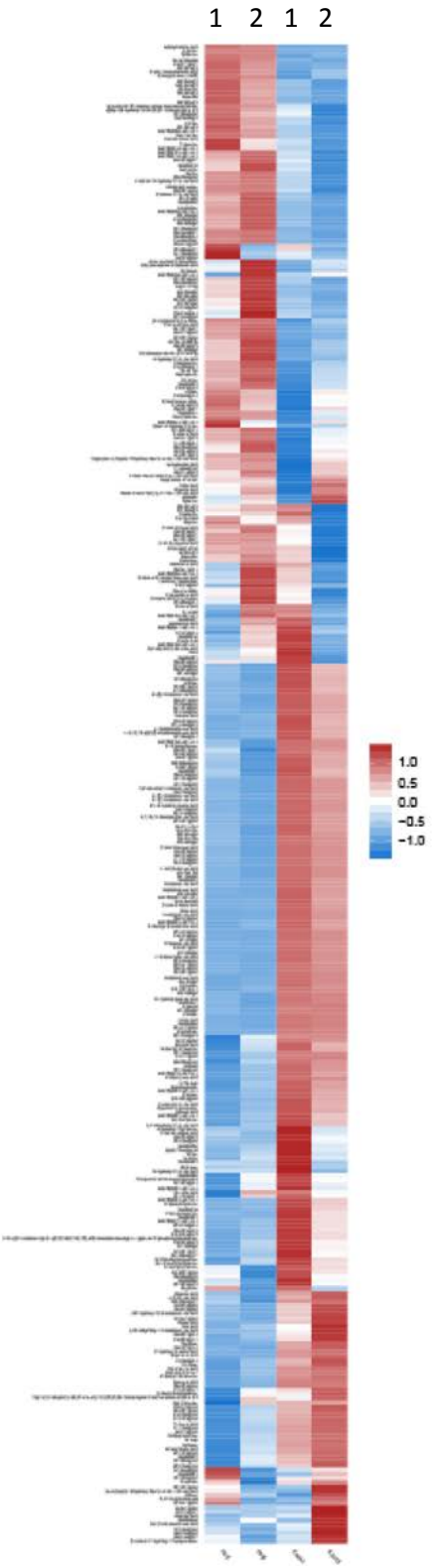


Abbildung 11: ‚Heatmap' der Serummetaboliten der Milch- (HF) und Fleischrind-Färsen (FR) ohne (1) und mit Habituation (2).

Aus den vorhergehenden Untersuchungen (Teilprojekt TP3.2) wurden die Metaboliten Cystathionine, Pregnenolone, Allopregnanolone und N-acetyl-cysteine als potentielle Kandidaten (Biomarker) des Verhaltens/Wohlbefindens identifiziert. Mit Ausnahme von Pregnenolone konnten alle potentiellen Kandidatenmoleküle in Serumproben der Färsen in Weidehaltung dargestellt werden. Die bei den

Tieren der verschieden Rassen bzw. Kreuzungen gemessenen Serumkonzentrationen von Allopreganolone, Cystathionine und N-acetyl-cysteine sind in der Abbildung 12 dargestellt.

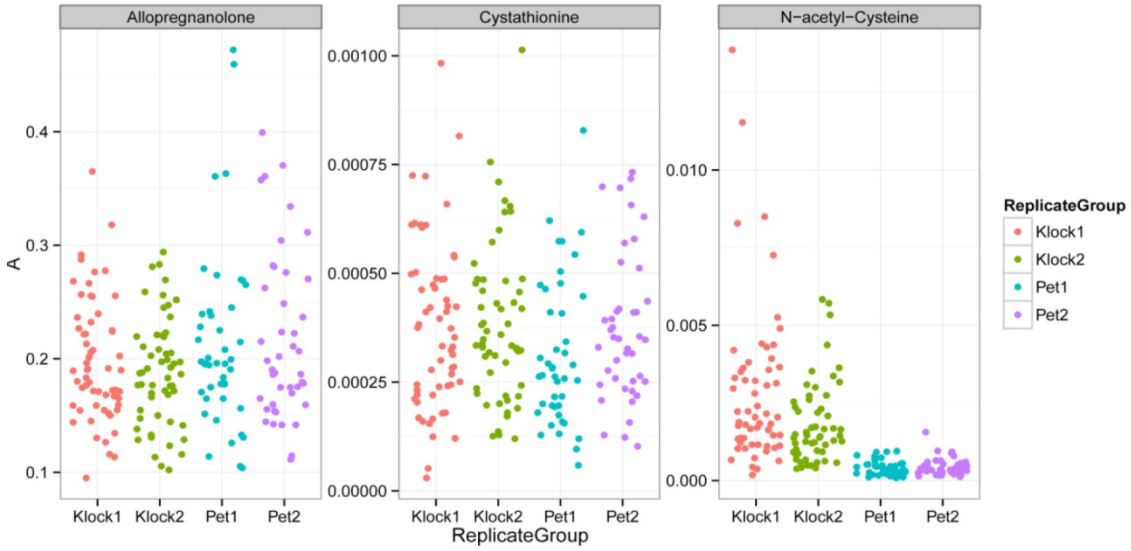


Abbildung 12: Verteilung der Serumkonzentrationen von Allopreganolone, Cystathionine und N-acetyl-cysteine bei Milch- (Pet) und Fleischrind-Färsen (Klock) ohne (1) und mit Habituation (2). Jeder Punkt repräsentiert die mittlere Serumkonzentration [ng/ml] eines Tieres.

Die Biomoleküle Allopreganolone und Cystathionine weisen bei allen Rassen bzw. Kreuzungen eine hohe interindividuelle Variabilität der Serumkonzentrationen auf, während N-acetyl-cysteine eine rassenspezifische Konzentrationsverteilung zeigt. Während bei den Fleischrindkreuzungen N-acetyl-cysteine eine ähnliche Verteilung wie Allopreganolone und Cystathionine zeigt, ist die Serumkonzentration von N-acetyl-cysteine bei den Holsteins sehr gering bei ebenfalls geringer Variabilität. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die habituierten Fleischrinder eine geringere N-acetyl-cysteine Konzentration gegenüber den nicht habituierten Fleischrindern aufwiesen.

Bei der Bearbeitung dieses Teilprojektes haben sich Abweichungen vom ursprünglichen Zeitplan ergeben. Bei kostenneutraler Verlängerung können die ursprünglichen Ziele des Teilprojekts erreicht werden. Die experimentelle Projektarbeit sollte ursprünglich zum 01.01.2012 mit 12-monatiger Verzögerung mit der Besetzung der Doktorandenstelle begonnen werden. Dieser ursprünglich geplante verspätete Beginn ergab sich daraus, dass das TP4.2. auf den Ergebnissen des TP3.2. aufbaut und dieses Projekt erst mit 15-monatiger Verspätung begonnen werden konnte (Ursachen s. Statusbericht TP3.2.). Allerdings konnte trotz viermaliger Ausschreibung der im Teilprojekt geplanten Doktorandenstelle und der gezielten Werbung in mehreren Universitäten/Lehrstühlen kein/e fachlich geeignete Bewerber/in gewonnen werden, so dass im Vergleich zum ursprünglich geplanten Beginn (01.01.2011) ein Verzug des offizielle Projektbeginns inklusive Stellenbesetzung und Mittelanforderung von 19 Monaten bestand. Durch erfolgreiche Bearbeitung der Arbeitsaufgaben 1 (Auswahl geeigneter Tierstrukturen und minimal-invasive Gewinnung der Gewebeproben) und 2 (Messung der Verhaltensphänotypen und Erfassung der Leistungsmerkmale) durch haushaltsfinanzierte Mitarbeiter/innen und das ‚Outsourcen' der Arbeitsaufgabe 3 (Typisierung der Tiere zur Darstellung der ausgewählten Biosignaturen) konnte der Verzug weitestgehend kompensiert werden.

2.2.4 Biosignaturen und Fütterungseinflüsse (TP 4.4)

2.2.4.1 Zielformulierung und abgeleitete Fragestellungen

Das Teilprojekt hatte das Ziel die Modulierbarkeit von Biosignaturen durch Fütterungseinflüsse zu untersuchen. Als Zieltierart wurde das wachsende Schwein gewählt und als Fütterungseinfluss die Versorgung mit der essentiellen Aminosäure Methionin (Met), welche in vielfacher Hinsicht - auch systemisch und (epi)genetisch - relevant ist und zwar in Besonderheit aus den folgenden Gründen:

a) Met ist aus stofflicher Sicht eine bedeutsame essentielle Aminosäure für die Synthese von Körperprotein. Zudem startet bei der Translation die Proteinbiosynthese durch das Start-Codon AUC mit Met. Damit ist Met zunächst immer die erste Aminosäure am N-Terminus eines entstehenden Proteins, ggf. mit nachfolgenden Modifikationen.

b) Met fungiert als wesentlicher Methylgruppendonor und beeinflusst somit potentiell über DNA-Methylierung die Expression von Genen.

c) Met führt über den enthaltenen Schwefel zu einer Verschiebung des Säure-Basen-Haushalts in Richtung metabolische Azidose und beeinflusst damit unter anderem auch das Gleichgewicht von Knochenformation zu -resorption.

d) Met wird bei monogastrischen Tieren ein verhaltensbeeinflussender Effekt zugeschrieben. Diesbezüglichen Berichten mangelt es indes bislang sowohl am theoretischen Konzept als auch am experimentellen Beweis.

Aus den genannten Gründen und unter Bezugnahme auf den Tierwohlaspekt sollte an mit Hilfe des Backtests von der Arbeitsgruppe TP 4.1 vorsortierten (Temperament entweder aktiv oder passiv) Ferkeln untersucht werden, wie sich eine deutliche Unter- bzw. Überversorgung (Versuchgruppe [VG] bzw. Ration A und C) wachsender Schweine mit Met im Vergleich zu einer bedarfsgerechten Versorgung (VG bzw. Ration B) auf

- zootechnische Merkmale (Futteraufnahme, Futteraufwand, Lebendmassezunahme, Schlachtkörperqualität),
- klinisch-chemische Variablen des Knochenstoffwechsels und
- das Verhalten/die Stresskompensation von Schweinen in der Phase vom Absetzen bis zur Schlachtreife auswirkt.

Weiterhin sollte über Mikroarray-Analyse von aus den Mastschweinen post mortem gewonnenen Leukozyten (PBMCs) in TP 2.1 untersucht werden wie die Met-Versorgung sowie die Verhaltenszuordnung (gemäß Backtest aktive oder passive Tiere) bzw. eine Wechselwirkung aus Beiden die Genregulation beeinflusst. Erste Ergebnisse dazu liegen vor. Diese Untersuchungen werden im Rahmen der PHÄNOMICS Nachwuchs-Forschergruppe „Phänotypisierung des Tierwohls“ fortgesetzt, welche noch bis einschließlich 2018 arbeitet. Ein Gesamtüberblick über die Ergebnisse ist zum Zeitpunkt des Abschlusses der Arbeiten der Nachwuchs-Forschergruppe zu erwarten.

2.2.4.2 Tiere, Material und Methoden

Versuchsort

Die Tierexperimente erfolgten in der Versuchsstation „Friedrich Harms“ der Universität Rostock in Dummerstorf. Dort bestehen umfängliche versuchstechnische Möglichkeiten für die Bearbeitung tierexperimenteller Fragestellungen. Neben Ferkeln, Aufzucht- und Mastschweinen können diverse Nutzgeflügelarten sowie kleine Wiederkäuer im Versuch gehalten werden. Für die Bearbeitung der Fragestellung im Rahmen von TP 4.4 wurden 60 Ferkel eingestallt.

Tiere

Die insgesamt für die Untersuchungen im Rahmen von TP 4.4 eingestallten Absetzferkel entstammten der Deutschen Landrasse. Aus Kapazitätsgründen erfolgte der Versuch in zwei Durchgängen (Durchgang I und II, DG I und II) mit je 30 Tieren. Das Versuchsdesign, die Umweltbedingungen, Haltung und Fütterung wurden in beiden Studien identisch gestaltet. Die Untersuchungszeit erstreckte sich von der Einstallung als Absetzferkel bis zur Schlachtreife (Abb.13).

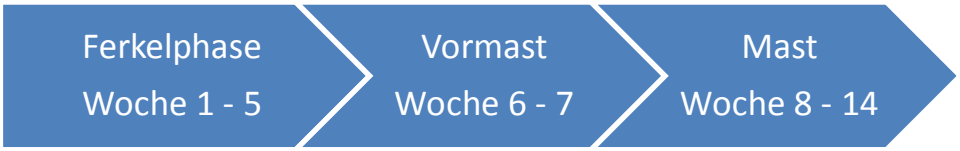


Abb. 13: Versuchsaufbau in der Mehrphasenfütterung

Die Ferkel für diesen Versuch stammten aus der Experimentalanlage Schwein des Leibniz Instituts für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf. Die Geburtsmassen lagen in DG I bei 1,52 ± 0,34 kg und in DG II bei 1,47 kg ± 0,23. Die Geburtsverläufe wurden dokumentiert. In DG I war bei den Ferkeln 5 und 6 aus Gruppe A und Tier 6 aus Gruppe C eine manuelle Geburtshilfe nötig. Im DG II wurde bei den Tieren 3, 4, 10 aus Gruppe A, 2, 3, 7, 10 aus Gruppe B und 1,6 in Gruppe C manuell unterstützt. Am 28. Lebenstag erfolgte das Absetzen der Tiere und noch im Herkunftsstall eine homogene Einteilung der Tiere bezüglich Geschlecht, Gewicht und Aktivität. Die Ferkel wurden in drei Gruppen zu je 10 Tieren zusammengestellt und bereits mit dem entsprechenden Ferkelfutter der jeweiligen Gruppe angefüttert. Am 32. bis 35. Lebenstag erfolgte mit Lebendmassen von 8,47 kg ± 1,53 für DG I und 9,17 kg ± 1,52 für DG II die Einstallung in den Versuch.

Die Ferkel sind in den ersten 4 Lebenswochen durch geschulte Mitarbeiter der Verhaltensforschung am FBN mittels Backtest in aktive oder passive Tiere eingeteilt worden.
Der Backtest wurde insgesamt 4-mal gemäß Hessing et al. (1993) durchgeführt (Alter: 5, 12, 19 und 26 Tage). Für den Backtest wurden die Ferkel rücklings in eine mit Zellulose gepolsterte Halterung gelegt und in dieser Position für 60 Sekunden gehalten, die linke Hand lose über dem Thorax, die rechte über den Hinterbeinen. Der Test startete, sobald das Ferkel regungslos lag und endete nach exakt 60 Sekunden. Gemessen wurden die Latenz bis zur ersten Abwehrreaktion sowie die Anzahl (Frequenz) und die Gesamtdauer aller Abwehrreaktionen (Zebunke et al. 2013). Nach den 4 Backtest-Wiederholungen wurden die Tiere in 3 Kategorien eingeteilt: passiv („low resisting“ bzw. LR), aktiv („high resisting“ bzw. HR) und intermediär („doubtful“) bzw. D (van Erp-van der Kooij 2000). Zeigte ein Tier in der Summe weniger als 4 Abwehrreaktionen, mit höchstens 2 Abwehrreaktionen je Test-Wiederholung wurde es als LR klassifiziert. Zeigte es in der Summe mehr als 4 Abwehrreaktionen, mit

mindestens 2 je Test-Wiederholung wurde es als HR klassifiziert. Alle anderen Tiere wurden der Kategorie D zugeordnet (Zebunke et al. 2013).

Es erfolgte, gemäß der Fragestellung, eine Einteilung der Tiere in 3 möglichst homogene Gruppen. Bei der Gruppenzusammenstellung wurden Geschlecht, Lebendmasse (LM) zur Geburt und zur Einstallung, Einstallalter und die Zuordnung aus dem Backtest berücksichtigt. Jede Gruppe bestand dementsprechend mit im Mittel annähernd gleichen LM zur Geburt und zur Einstallung sowie einer homogenen Verteilung aus dem Backtest. Die Gruppeneinteilung der Versuchstiere ist Abb. 14 zu entnehmen.

Die Versuchsreihe endete mit der Schlachtung der Tiere. Als Schlachtmasse wurde über den Durchschnitt der Gruppe 90 kg angestrebt. Dies ist mit dem praxisüblichen Schlachtgewicht von 90 bis 100 kg LM begründet.

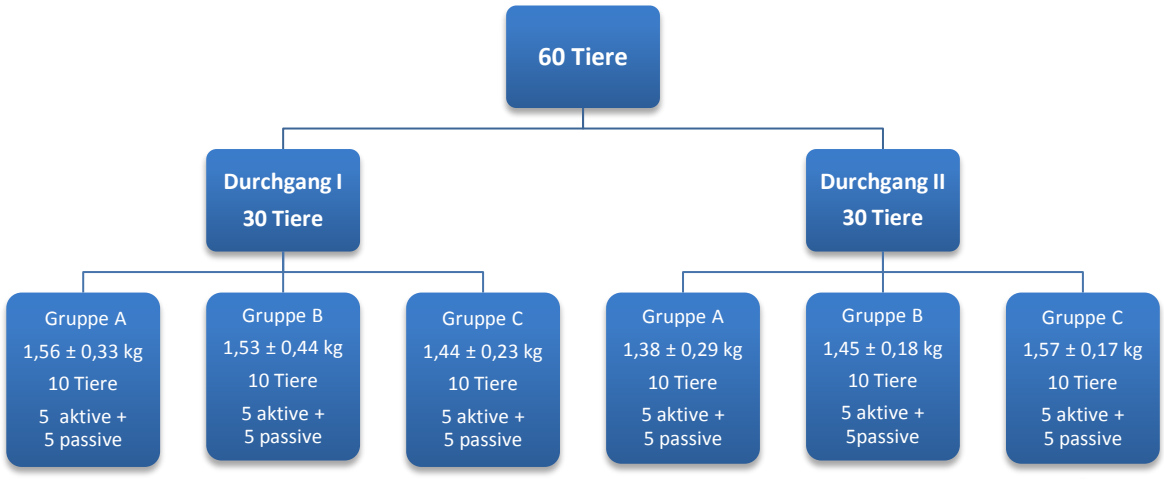


Abb. 14: Versuchsanordnung der Tiere

Haltung

Die Ferkel wurden während der anfänglichen, 5-wöchigen Ferkelphase in Einzelflatdeckbuchten mit den Maßen 1,20 m x 0,65 m gehalten. Die Tiere wurden einzeln aufgestallt und durch die Trenngitter bestand ungehinderter Sichtkontakt zu den Nachbarn. Die Buchten waren mit Vollspaltenböden, einer Nuckeltränke und entnehmbaren Trögen ausgestattet. Die genaue Belegung der Buchten kann anhand von Abb. 15 nachvollzogen werden. Bei der Belegung der Buchten wurden die Tiere so eingeordnet, dass sie keinen direkten Nachbarn aus ihrer jeweiligen Versuchsgruppe haben.

Für den anschließenden 9-wöchigen Mastversuch wurden die Tiere umgestallt. Für diese Versuchsphase wurden die Schweine in Einzelfutterbuchten auf Betonspaltenboden gehalten. Die Buchten waren mit Trenngittern unterteilt. Der Sichtkontakt zu anderen Tieren war möglich. Jede Bucht konnte einzeln geöffnet bzw. geschlossen werden. Auf diese Weise konnte jedes Tier separat aus der Bucht entlassen werden. Die Mastplätze waren mit einem Fresstrog versehen, der von oben aus befüllt und zur Futterrückwaage herausgenommen werden konnte. Die Anordnung der Buchten entspricht der aus dem Ferkelstall wie in Abbildung 15 veranschaulicht.

C 10		B 10		A 10		C 9		B 9		A 9		C 8		B 8		A 8		C 7		B 7		A 7		C 6		B 6		A 6	
m	p	m	a	m	p	m	a	m	a	m	a	m	a	m	p	m	p	w	a	w	p	w	a	w	p	w	p	w	p
Futtergang																													
m	p	m	p	w	p	w	p	w	a	w	a	m	a	w	a	w	a	m	a	m	p	m	a	w	a	w	a	m	p
A 1		B 1		C 1		A 2		B 2		C 2		A 3		B 3		C 3		A 4		B 4		C 4		A 5		B 5		C 5	

Abb. 15: Anordnung der Tiere im Ferkel- und Maststall (männlich: m, weiblich: w; passiv: p, aktiv: a; Versuchsgruppen: A, B und C; Tiernummern: 1 – 10 in jeder Gruppe)

Fütterung

Zur Bearbeitung der Fragestellung inwieweit die Auslenkung eines Fütterungsbestandteiles Einfluss auf die Biosignaturen hat, wurde die Aminosäure Met als Variable der Ration ausgewählt. Dabei sollte eine unterschiedliche Deckung des Met-Bedarfes, bei Konstanz der anderen Bestandteile der Ration, untersucht werden. Die Fütterung erfolgte als Mehrphasenfütterung die sich in zwei Ferkel-, eine Vormast- und 2 Mastphasen untergliedert (Abb. 16). Die Tiere wurden *ad libitum* mit Futter versorgt und hatten über eine Nippeltränke permanenten Zugang zu frischem Tränkwasser.

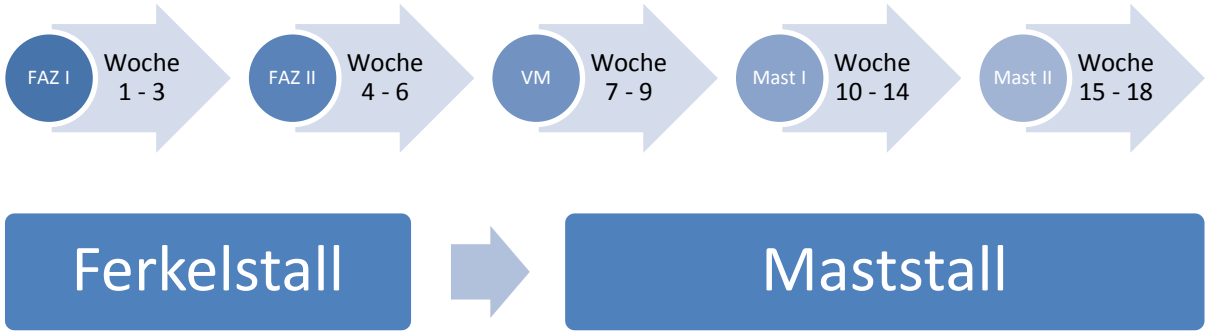


Abb. 16: Fütterungsregime während der Versuchswochen (Ferkelaufzuchtfutter I und II, FAZ I und II; Vormastfutter, VM; Mastfutter I und II, Mast I und Mast II)

In jedem Zeitabschnitt wurde ein dem Entwicklungstand entsprechendes Futter verabreicht. Die Tiere erhielten zu Beginn des Versuches über Versuchswoche (VW) 1 bis 3 Ferkelaufzuchtfutter I (FAZ I). Ab der 4. Versuchswoche (VW) wurden die Ferkel bei einer mittleren LM von etwa 20 kg auf FAZ II umgestellt. Ab der 6. VW bei einer mittleren LM von 30 kg erfolgte die Umstellung auf Vormastfutter. Darauf folgend von VW 10 bis 14 wurde Mastfutter I ab 40 kg LM und anschließend Mastfutter II (70 kg LM) ab der 15. VW bis zur Schlachtung in der 18. Woche gefüttert.

Bei dem verabreichten Futter handelte es sich um ein pelletiertes Mischfutter, welches als Alleinfutter mit Pelletdurchmessern von 2 mm für die FAZ und 3 mm für das Vormast- und die Mastfutter *ad libitum* gegeben wurde. Jedes Futtermittel der drei VG (A, B, C) unterschied sich im Gehalt an Met. Die Alleinfuttermittel der VG A sollten dazu führen, dass der Met-Bedarf der Tiere um 30 % unterschritten wird. Synthetisches Met wurde nicht zugesetzt. Es enthielt nur die originär durch das Futtermittel selbst schon enthaltene Menge an dieser Aminosäure. Die Alleinfuttermittel der VG B sollten bei adäquater Aufnahme dem Bedarf der Tiere nach den aktuellen Versorgungsempfehlungen (GfE 2006,

mod. nach Krüger 2011, pers. Mitteilung) über eine Zugabe von DL-Methionin angepasst sein (Kontrolle). Die Tiere der Gruppe C erhielten dagegen Alleinfuttermittel, welche ebenfalls mit DL-Methionin ergänzt worden waren, und zu einer Met-Aufnahme von 30 % über den Versorgungsempfehlungen führen sollten. Einen Überblick über die Zusammensetzung und kalkulierten Nährstoffkonzentrationen in den eingesetzten Alleinfuttermitteln enthalten die Tabellen 9 und 10.

Tab. 9: Zusammensetzung und kalkulierte Nährstoffkonzentration der Ferkelaufzuchtfutter (FAZ)

	FAZ I VG A	FAZ I VG B	FAZ I VG C	FAZ II VG A	FAZ II VG B	FAZ II VG C
		Anteil [%]			Anteil [%]	
TM [%]	88,8	88,9	88,9	88,6	88,6	88,6
SES (44 % XP)	23,5	23,5	23,5	15,5	15,5	15,5
Gerste	15,0	15,0	15,0	25,0	25,0	25,0
Weizen	36,0	35,6	35,2	44,0	43,7	43,3
Gerstenflocken	15,0	15,0	15,0	10,0	10,0	10,0
Molkenpulver, süß	5,0	5,0	5,0	-	-	-
Mineralfutter + AMINO RAM RO	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Sojaöl	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
DL-Methionin	-	0,37	0,8	-	0,34	0,7
		[%]			**[%]**	
Rohprotein	19,0	19,0	19,1	16,4	16,4	16,5
Rohfett	3,4	3,4	3,4	3,6	3,6	3,6
Rohfaser	3,3	3,3	3,2	3,4	3,4	3,4
Rohasche	5,4	5,4	5,4	4,8	4,8	4,8
Stärke	39,0	38,8	38,5	45,7	45,5	45,3
Lysin	1,3	1,3	1,3	1,1	1,1	1,1
Met + Cystein	0,6	0,8	0,9	0,5	0,7	0,8
Methionin	0,3	0,4	0,6	0,2	0,4	0,5
Threonin	0,9	0,9	0,9	0,7	0,7	0,7
Tryptophan	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Isoleucin	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7
Valin	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7
Leucin	1,3	1,3	1,3	1,0	1,0	1,0
Histidin	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,9
Arginin	1,2	1,1	1,1	0,9	0,9	0,9
Phenylalanin	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7

Met, Methionin; SES, Sojaextraktionsschrot; TM, Trockenmasse; VG, Versuchsgruppe; XP, Rohprotein

Tab. 10: Zusammensetzung und kalkulierte Nährstoffkonzentration der Vormast- (VM) und Mastfutter (MF)

	VM VG A	VM VG B	VM VG C	Mast I VG A	Mast I VG B	Mast I VG C	Mast II VG A	Mast II VG B	Mast II VG C
	Anteil [%]			Anteil [%]			Anteil [%]		
TM [%]	87,9	88,0	88,0	87,8	87,8	87,8	87,7	87,7	87,7
SES (44 % XP)	15,5	15,5	15,5	13,0	13,0	13,0	9,3	9,3	9,3
Gerste	30,0	29,8	29,2	33,5	33,3	33,0	37,5	37,3	37,1
Weizen	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Mineralfutter + AMINO MIN	3,5	3,5	3,5	3,0	3,0	3,0	2,8	2,8	2,8
Sojaöl	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5	1,5
DL-Methionin	-	0,25	0,85	-	0,2	0,5	-	0,16	0,4
	[%]			[%]			[%]		
Rohprotein	16,4	16,5	16,6	15,7	15,7	15,8	14,5	14,5	14,5
Rohfett	3,0	3,0	3,0	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Rohfaser	3,4	3,4	3,4	3,5	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4
Rohasche	5,1	5,0	5,0	4,6	4,6	4,6	4,2	4,2	4,2
Stärke	45,5	45,4	45,1	47,1	47,0	46,8	48,9	48,8	48,7
Lysin	1	1	1	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8
Met + Cystein	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Methionin	0,2	0,3	0,6	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4
Threonin	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Tryptophan	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Isoleucin	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5
Valin	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6
Leucin	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0
Histidin	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3
Arginin	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8
Phenylalanin	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7

Met, Methionin; SES, Sojaextraktionsschrot; TM, Trockenmasse; VG, Versuchsgruppe; XP, Rohprotein

Mineralisches Ergänzungsfuttermittel wurde den Alleinfuttermitteln in einem Anteil von 3 % zugemischt. Die Angaben über Inhaltsstoffe und Zusatzstoffe des mineralischen Ergänzungsfuttermittels laut Herstellerempfehlungen sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Tab. 11: Deklaration des im Alleinfutter verwendeten mineralischen Ergänzungsfuttermittels

Inhaltsstoffe		je kg Alleinfuttermittel (Gehalt im Alleinfutter: 3,0 %)	je kg Mineralfutter
Rohprotein	[%]	0,420	14,0
Rohasche	[%]	2,340	78,0
Lysin	[%]	0,270	9,0
Threonin	[%]	0,114	3,8
Calcium	[%]	0,600	20,0
Phosphor	[%]	0,045	1,5
Natrium	[%]	0,180	6,0
Magnesium	[%]	0,030	1,0
Zusatzstoffe			
Vitamin A3	[I.E.]	10.500	350.000
Vitamin D3	[I.E.]	1.200	40.000
Vitamin E	[mg]	75	2.500
Vitamin B1	[mg]	1,2	40
Vitamin B2	[mg]	3,6	120
Vitamin B6	[mg]	3,6	120
Vitamin B12	[mg]	24	800
Nicotinsäureamid	[mg]	24	800
Ca-Pantothenat	[mg]	9,6	320
Cholinchlorid	[mg]	180	6.000
Betain	[mg]	105	3,500
Eisen als Sulfat	[mg]	124,99	4.166,6
Kupfer als Sulfat	[mg]	15	500
Zink als Oxid	[mg]	109,99	3.666,6
Mangan als Oxid	[mg]	75	2.500
Jod als Jodat	[mg]	1,05	35
Selen als Selenit	[mg]	0,45	15
Kobalt als Carbonat	[mg]	0,15	5
Loxidan	[mg]	45	1.500
3-Phytase	FTU	750	25.000

Verhaltensbeobachtung

Zur Ermittlung von Verhaltensmerkmalen der Tiere wurden drei Beobachtungsverfahren angewendet. Zum einen wurde der wöchentliche Wiegetermin der Schweine gleichzeitig auch als Termin zum Scoring des Verhaltens in der ungewohnten Situation genutzt. Weitere Beobachtungen erfolgten über eine 24-stündige Videoüberwachung ausgewählter Tiere. Die dritte Erfassung von Verhaltensmerk-

malen wurde über Herzfrequenzmessung zu zwei definierten Zeitpunkten je Versuchswoche vorgenommen. Eine Übersicht über die Beobachtungsverfahren gibt Tabelle 12.

Tab. 12: Zur Verfassung von Verhaltensmerkmalen angewendete Verfahren

Nr.	Verfahren	Anzahl Tiere	Dauer der Beobachtung	Variable
1	Scoring des Verhaltens während der Wiegetermine	2 x 30	1 x pro Woche über die gesamte Versuchsdauer	Note 1 bis 5
2	Videobeobachtung	2 x 12	1 x pro Woche über 24 h/d während der gesamten Versuchsdauer	Beschreibung der Verhaltensweisen zu ausgewählten Zeitpunkten
3	Herzfrequenzmessung	30	2 x pro Woche zum Wiegetermin und in Ruhe	Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität

zu 1 – Scoring des Verhaltens während der Wiegetermine

Die Schweine wurden einmal wöchentlich vor der morgendlichen Fütterung gewogen. Dieses Ereignis war mit einer für die Schweine zunächst neuen und Stress verursachenden Situation verbunden und kann somit als Challenge bezeichnet werden. Für diese Untersuchung wurden alle 60 Tiere herangezogen. Dabei mussten die Schweine während der Ferkelphase aus Ihrer Bucht heraus in einen Wiegekäfig gehen, welcher direkt vor die Öffnung der Bucht geschoben wurde. Dabei griff ein Helfer unterstützend von oben in die Käfige und schob das Ferkel in Richtung der geöffneten Tür in den Wiegekäfig.

Während der anschließenden Phase im Maststall war die Waage zentral angeordnet und die Schweine bewältigten den Weg bis zur Waage selbstständig mit Unterstützung des Beobachters durch ein Treibbrett. Nachdem die Buchtentür zum Gang hin geöffnet wurde liefen die Tiere über den Betonboden bis zur Tierwaage. Die zu bewältigende Strecke unterschied sich dabei je nach Standort des Tieres im Stall zwischen 3 und 15 m. Dabei wurde abgesichert, dass in der Summe die Tiere aller drei Gruppen dieselbe Entfernung zu bewältigen hatten. Bei Bedarf wurde mit Hilfe des Treibbretts unterstützt.

Zur quantitativen Erfassung des Verhaltens während dieses wöchentlichen Ereignisses wurde ein 5-stufiger Score entwickelt. Über diese als „Test for Adaptive Response to a Challenge“ (ART) bezeichneten Score wurde der Umgang des Tieres mit der neuen Situation erfasst und einem verbal zu beschreibenden Verhalten eine Stufe zwischen 1 (ruhig, teilnahmslos) bis 5 (starke Lautäußerung, hektische Bewegungen) zugeordnet. Die Einteilung in die Verhaltens-Stufen wurde immer und ausnahmslos von derselben Person vorgenommen um den individuellen Einfluss möglichst gering zu halten. Dabei war die Einordnung der Schweine in aktive oder passive Tiere aus dem Backtest dem Beobachter nicht bekannt. Tabelle 13 charakterisiert den entwickelten Verhaltensscore ART.

Tab. 13: Stufen des Verhaltenscores ART zur Charakterisierung des Verhaltens von Schweinen bei einem Challenge

		Beschreibung	
Stufe	Aktivität	Verhalten	Lautäußerung
1	passiv	teilnahmslos	keine
2	ruhig	unaufgeregt	keine
3	entspannt	interessiert	wenig lautgebend
4	aktiv	lebhaft	lautgebend
5	hektisch	aufgeregt	sehr stark

zu 2 - Videobeobachtung

Für weitere detaillierte Verhaltensbeobachtungen wurden die 30 Tiere aus dem zweiten Untersuchungsdurchgang herangezogen.

Neben der Beurteilung über den ART-Verhaltenscore wurde die zweite Säule der Verhaltensbeobachtung durch eine 24 h andauernde Videoüberwachung von 12 Tieren realisiert. Die beobachtete Schweinegruppe setzte sich aus vier Tieren je Met-Versorgungsstufe und davon je zwei aktive und passive Tiere verschiedenen Geschlechts zusammen. Aus der Gruppe A (Met-Unterversorgung) wurden die Ferkel A4 und A7 als aktive und A2 und A10 als passive Tiere in die Beobachtungsauswertung einbezogen. Die Gruppe B (Met-Versorgung bedarfsgerecht) setzte sich aus den Tieren B2 und B9 (aktiv) sowie B4 und B7 (passiv) zusammen. Die Gruppe C (Met-Überversorgung) bestand aus den Ferkeln C1 und C7 als aktive sowie C4 und C9 als passive Vertreter. Im Versuchsstall waren 4 Kameras angebracht und so angeordnet, dass jeweils drei Tiere mit einer Kamera überwacht werden konnten (siehe Abbildung 17). Die Pfeile in Abbildung 17 zeigen die Anordnung der Kameras im Ferkel- und Maststall an. Die Beobachtung erfolgte über den gesamten Versuchszeitraum des zweiten Prüfdurchganges mittels CCD-Kameras.

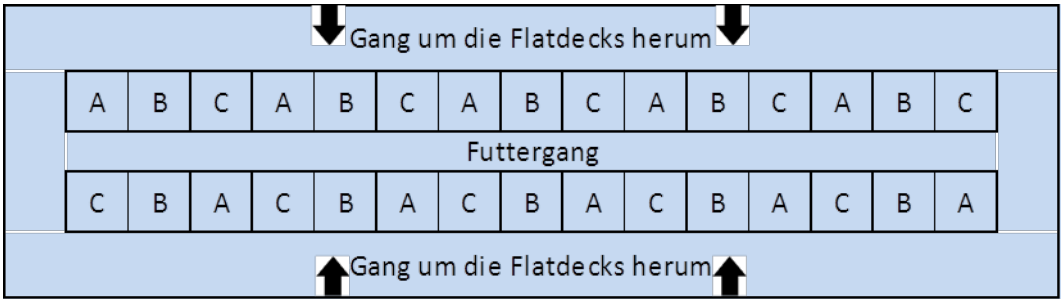


Abb. 17: Anordnung der Videokameras in Ferkel- und Maststall (Die Großbuchstaben verdeutlichen die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Gruppen)

Da das gewonnene Datenmaterial sehr umfangreich war, wurden zunächst zwei Tage in bestimmten Wochen für die Auswertung ausgewählt. Die Auswahl erfolgte nach umfangreichen Voruntersuchungen und wurde als repräsentativ eingestuft. An den zwei wöchentlichen Untersuchungstagen wurden drei Stunden Beobachtungszeit ausgewertet. Die untersuchten Zeiträume lagen zwischen 09:30 und 10:30 Uhr sowie zwischen 14:00 und 16:00 Uhr. Die Zeiträume der Beobachtung wurden für beide Wochentage gleich gewählt.

Innerhalb der untersuchten Wochentage wurde der Montag ausgewählt, da an diesem Tag auch die Herzfrequenz sowie die Lebendmasse der Tiere gemessen wurden. Der zweite untersuchte Wochentag war der jeweilige Freitag. Dieser stellte einen Gegenpol zu dem mit Stress verbundenen Montag dar, derart, dass er bis auf die tägliche Routine vergleichsweise reizarm war.

In den untersuchten Zeiträumen wurden folgende Aktivitäten für jedes Schwein notiert: „Liegen in Bauchlage“ (1), „Liegen in Seitenlage“ (2), „Fressen“ (3), „Kontakt zum Nachbarn“ (4), „Käfig-Knabbern“ (5), „Sitzen“ (6), „undefiniertes Verhalten“ (7) und „Trinken“ (8). „Undefiniertes Verhalten“ (7) stellt einen Sammelbegriff für Hin- und Herlaufen, Hin- und Herspringen sowie Schnüffeln dar. Außerdem wurden vorab die folgenden Bedingungen festgelegt:

i) der Kontakt zum Nachbarn wird nur als solcher gewertet, wenn er länger als 5 Sekunden andauert,
ii) wenn zwei der unter (1) bis (8) genannten Aktivitäten zur gleichen Zeit auftraten, gibt es die folgenden Prioritäten zu beachten: (3), (4) und (5) haben Vorrang vor (1), (2), (6), (7) und (8).

Zur Ermittlung dieser Verhaltensweisen wurden die Videodateien durch den Beobachter in Echtzeit angeschaut und die Zeiten (in sec.), für die unterschiedlichen Verhaltensweisen während des Untersuchungszeitraumes für die 12 beobachteten Tiere dokumentiert und für die weitere Bearbeitung in einer Excel Tabelle aufbereitet.

zu 3 - Herzfrequenzmessung

Eine weitere Untersuchung bezüglich des Verhaltens / der Stresskompensation der Schweine wurde über Messungen zur Herzfrequenz und Kalkulationen zur Herzfrequenzvariabilität vorgenommen. Dabei wurde den 30 Tieren des zweiten Untersuchungsdurchganges nach einem festgelegten Schema eine Polar – Herzfrequenzmesstechnik (Polar Electro GmbH Deutschland, 64572 Büttelborn) umgelegt. Die Messungen erfolgten wöchentlich jeweils montags zum Challenge während des Wiegetermins um den Umgang mit der ungewohnten Situation zu verfolgen. Als Referenzwert wurde, ebenfalls wöchentlich, an einem ereignislosen Wochentag (Donnerstag) zur selben Uhrzeit die gleiche Messung ohne äußere Beeinflussungen durchgeführt. Dabei wurde den Schweinen der ursprünglich für Pferde konzipierte Messgurt mit inliegender Mess- und Erfassungstechnik hinter den Schulterblättern um den Bauch angelegt. Es standen 6 Messgeräte zur Verfügung. Der Beginn der Messungen wurde abwechselnd an einem Ende der beiden Standreihen vorgenommen, so dass die Reihenfolge der Messung an den Tieren variiert. Ab diesem Anfangstier wurde die Messung in der Reihe fortlaufend weiter geführt. Nachdem die ersten 6 Tiere nacheinander die Gurte umgelegt bekommen hatten, wurde bei dem zuerst Gemessenen der Gurt wieder entfernt und dem 7. Tier umgelegt und so dann fortlaufend weiter verfahren. Die Dauer der Messung pro Tier betrug im Durchschnitt 5 bis 7 Minuten. Für einen ausreichenden Kontakt zwischen den Messelektroden und der Hautoberfläche wurden die Elektroden vor dem Umlegen mit einem Schwamm und klarem Wasser reichlich benetzt. Grobe Verschmutzungen am Tier wurden vorab entfernt. Um den Gurt ausreichend gespannt zu halten wurde er mit Hilfe einer Beutelklammer fixiert.

Datenerfassung

Die Erfassung der im Versuch untersuchten Variablen unterteilte sich in Futtermittelanalyse, praecaecale Verdaulichkeit von Aminosäuren (an Minipigs mit Ileorektalanastomose nach den

Vorschriften der GfE), zootechnische Daten zur Lebendmasseentwicklung, zur Futteraufnahme und Futterverwertung, Verhaltensmerkmale und abschließend Schlachtdaten. Weiterhin wurde das Futterwahlverhalten von Absetzferkeln in einem Cafeteria-Versuch getestet.

Der Gesundheitsstatus der Schweine wurde täglich zweimal kontrolliert. Dabei wurde primär das subjektive Erscheinungsbild durch geschulte Mitarbeiter der Versuchsanlage erfasst. Bei Auffälligkeiten wurde die Körpertemperatur gemessen und das Tier weiter überwacht. Mögliche tierärztliche oder unterstützende Maßnahmen wurden protokolliert. Zweimal täglich wurde eine der Kot hinsichtlich seiner Konsistenz bonitiert. Weicher und ungeformter Kot sowie Durchfall wurden erfasst und eventuell erforderliche Behandlungen dokumentiert.

Die erfassten zootechnischen Parameter umfassen die LM zu verschiedenen Zeitpunkten im Wachstumsverlauf, die Lebendmassezunahme (LMZ), den Futterverzehr (FV) und den Futteraufwand (FA). Die Ermittlung der LM erfolgte nach einem festen Rhythmus einmal wöchentlich vor der Morgenfütterung mittels Waagen mit Tierwägeprogramm. Für die Ferkelphase wurde das Modell Kern Waage DE 150K200XL (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) genutzt. Bei den Masttieren kam die Waage REHWA 83 Z (Rhewa Waagenfabrik, Mettmann, Deutschland) zum Einsatz. Die Bestimmung des Futterverzehrs erfolgte über eine wöchentliche Rückwaage der im Trog des jeweiligen Tieres verbliebenen Futtermengen (Kern DE 12K 1N Waage, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland).

Die Überwachungstechnik für die Videoüberwachung der ausgewählten Tiere bestand aus CCD-Kameras des VisorTech Profiüberwachungs-Sets (PEARL GmbH, Buggingen, Deutschland), welches zusätzlich einen Recorder und einen Monitor umfasst. Die Kameras nehmen 24 Stunden am Tag Daten auf. Die erhobenen Videodaten wurden auf eine externe Festplatte überspielt, so dass sie mit Hilfe des DVR – Clients auf dem Computer abgespielt werden konnten.

Für die Herzfrequenzmessungen an den Ferkeln wurde mit dem POLAR Equine RS800CX (Polar Electro GmbH Deutschland, Büttelborn) gearbeitet, welches auch im Pferdesport genutzt wird. Hierbei wurden den Pferden Messgurte umgelegt, die Messdaten dann anschließend am PC ausgelesen und mit dem Programm Kubios am PC ausgewertet. Es wurde die Herzfrequenz, Parameter der Herzfrequenzvariabilität und Beat-to-Beat-Ergebnisse gemessen bzw. berechnet.

Am Ende des Versuchszeitraumes in der 18. Versuchswoche erfolgte die Schlachtung der 60 Tiere im Schlachthaus des FBN Dummerstorf. Zur Schlachtung wurden 37 schlachtkörperspezifische Variablen je Tier erfasst. Zeitgleich erfolgte die Beprobung bestimmter Gewebe durch Mitarbeiter von TP 4.2 (Prof. Klaus Wimmers) zur weiteren Auswertung auf genomische Merkmale.

2.2.4.3 Ergebnisse

Gehalt des Versuchsfutters an Rohnährstoffen, Methionin und Energie

Tabelle 14 enthält Angaben zum analysierten Rohnährstoffgehalt in den im Versuch eingesetzten und als Sammelprobe während des Versuches erfassten Alleinfuttermitteln.

Bei der Rationsberechnung wurde eine durchschnittliche Abweichung des Met-Gehaltes von 30% nach unten (Gruppe A) und oben (Gruppe C) von der Referenzgruppe B angestrebt. Tabelle 16 zeigt die analysierten Met-Gehalte in den während des Versuches genommenen Futtermittel-Sammelproben sowie die tatsächlich realisierten Abweichungen zur Referenzgruppe B, gesondert für die Versuchsdurchgänge I und II.

Tab. 14: Nährstoffgehalt der im Versuch eingesetzten Alleinfuttermittel (Analysenergebnisse)

Futtertyp (VG)	TM	Roh-asche	Roh-protein	Roh-fett	Roh-faser	NDF	ADF	ADL	Zucker	Stärke
	(in % für TM, Übrige in % der TM)									
FAZ I (A)	88,2	6,0	22,3	3,4	5,3	16,9	6,7	1,6	6,0	41,3
FAZ I (B)	88,1	6,1	22,8	3,4	5,1	14,8	6,4	1,4	6,5	42,1
FAZ I (C)	88,1	5,9	22,4	3,7	5,3	14,0	6,6	1,2	5,6	41,8
FAZ II (A)	87,5	5,1	19,8	3,7	4,6	17,0	5,4	1,6	3,8	50,5
FAZ II (B)	87,5	5,2	20,6	3,8	4,7	14,9	6,0	1,7	3,7	51,1
FAZ II (C)	87,8	5,2	20,2	3,7	5,1	16,1	6,0	1,4	3,4	52,1
VM (A)	86,0	5,7	19,2	3,2	5,6	15,9	6,5	1,4	2,9	49,7
VM (B)	85,8	5,7	19,2	3,2	5,6	15,4	6,5	1,3	3,4	49,7
VM (C)	85,6	5,6	19,7	3,3	5,1	14,4	5,7	1,4	2,8	50,5
Mast I (A)	86,3	5,3	19,8	2,9	4,9	14,9	5,9	1,5	3,6	53,7
Mast I (B)	86,2	5,2	19,1	3,0	5,2	15,5	5,6	1,6	3,8	53,7
Mast I (C)	86,1	5,0	18,7	3,2	5,3	16,2	6,1	1,2	3,2	54,4
Mast II (A)	86,1	4,7	17,0	3,1	5,8	17,8	6,7	1,4	3,4	54,8
Mast II (B)	86,2	4,8	17,0	3,0	5,9	18,1	7,1	1,6	3,4	54,8
Mast II (C)	86,3	4,7	17,6	3,0	5,7	17,5	6,6	1,7	3,2	55,0

TM, Trockenmasse; VG, Versuchsgruppe

In Tabelle 15 sind zudem die nach GfE (2008) aus den analysierten Rohnährstoffen und Stärke berechneten Gehalte an Umsetzbarer Energie in Mischfuttermitteln für Schweine (ME_S) dokumentiert.

Tab. 15: Gehalte an Umsetzbarer Energie der im Versuch eingesetzten Alleinfuttermittel für Schweine ME_S; berechnet nach GfE 2008 aus Analysenergebnissen)

Alleinfuttertyp	Versuchsgruppe	ME_S [MJ/kg TM]
FAZ I	A	14,7
FAZ I	B	14,8
FAZ I	C	14,8
FAZ II	A	15,1
FAZ II	B	15,2
FAZ II	C	15,0
VM	A	14,5
VM	B	14,6
VM	C	14,8
Mast I	A	14,9
Mast I	B	14,8
Mast I	C	14,8
Mast II	A	14,5
Mast II	B	14,4
Mast II	C	14,6

FAZ I und II, Ferkelaufzuchtfutter I und II; TM, Trockenmasse; VM, Vormastfutter; Mast I und II, Mastfutter I und II

Tab. 16: Methioningehalte der im Versuch eingesetzten Alleinfuttermittel (Analysenergebnisse)

		Durchgang I			Durchgang II		
VG	Futter-typ	Met [g/kg TM]	Met [g/kg]	Met (Differenz zu VG B, in %)	Met [g/kg TM]	Met [g/kg]	Met (Differenz zu VG B, in %)
A	FAZ I	2,91	2,56	- 25,44	3,00	2,68	-23,37
B	FAZ I	3,91	3,44		3,90	3,49	
C	FAZ I	5,05	4,45	+29,33	5,21	4,67	+33,52
A	FAZ II	2,82	2,46	- 23,80	2,82	2,49	-24,09
B	FAZ II	3,70	3,23		3,70	3,28	
C	FAZ II	4,77	4,19	+29,55	4,63	4,12	+25,45
A	VM	2,46	2,11	-28,16	2,66	2,33	-18,56
B	VM	3,43	2,94		3,28	2,86	
C	VM	5,20	4,45	+51,32	5,16	4,49	+57,02
A	Mast I	2,62	2,26	-19,50	2,39	2,08	-15,43
B	Mast I	3,25	2,80		2,82	2,46	
C	Mast I	4,13	3,56	+26,80	3,91	3,39	+37,95
A	Mast II	2,34	2,01	-19,70	2,21	1,91	-18,03
B	Mast II	2,91	2,51		2,69	2,33	
C	Mast II	3,81	3,29	+31,26	3,54	3,07	+31,47

TM, Trockenmasse; VG, Versuchsgruppe

Praecaecale Verdaulichkeit von Rohprotein und Aminosäuren

Ergebnisse zu der an Minipigs mit Ileorektalanastomose (n = 6) gemessenen praecaecalen Verdaulichkeit von Aminosäuren sind zu FAZ I in Tabelle 17 zusammengestellt.

Tab. 17: Scheinbare Verdaulichkeit von Aminosäuren (in %) aus FAZ I

Aminosäure	Versuchsgruppe A	Versuchsgruppe B	Versuchsgruppe C
Lysin	89,0 ± 1,09	88,8 ± 3,03	89,2 ± 1,11
Methionin	84,0 ± 2,46[c]	87,3 ± 2,43[b]	90,6 ± 0,72[a]
Cystein	87,7 ± 2,00	87,6 ± 1,48	86,8 ± 1,40
Threonin	85,9 ± 1,50	86,2 ± 2,45	86,6 ± 1,38
Isoleucin	84,6 ± 1,40	85,0 ± 2,97	84,3 ± 1,11
Valin	83,4 ± 1,55	84,6 ± 3,08	83,3 ± 1,19
Leucin	86,9 ± 1,26	86,9 ± 2,61	86,8 ± 1,14
Tyrosin	83,2 ± 2,41	85,5 ± 1,89	84,4 ± 1,19
Histidin	84,3 ± 2,45	83,7 ± 2,13	84,9 ± 1,77
Alanin	77,2 ± 2,71	76,3 ± 7,41	75,3 ± 5,51
Arginin	90,8 ± 1,12	90,9 ± 1,30	90,8 ± 0,92
Asparaginsäure	84,1 ± 1,37	84,0 ± 3,06	84,3 ± 0,74
Glutaminsäure	93,1 ± 0,88	92,9 ± 1,50	92,5 ± 0,60
Glycin	80,6 ± 1,71	80,4 ± 3,70	80,2 ± 1,04
Phenylalanin	88,4 ± 1,24	88,5 ± 2,05	88,1 ± 1,12
Prolin	91,3 ± 1,09	91,0 ± 2,00	91,0 ± 0,91
Serin	88,7 ± 1,31	89,0 ± 1,70	89,1 ± 1,04

FAZ I, Ferkelaufzuchtfutter I; [a, b, c] mit $p < 0,05$ signifikante Mittelwertdifferenzen innerhalb einer Zeile

Der ansteigende Gehalt an Met im Alleinfutter war mit einer Zunahme der praecaecalen Verdaulichkeit dieser Aminosäure verbunden ($p < 0,05$). Die praecaecale Verdaulichkeit der weiteren gemessenen, proteinogenen Aminosäuren unterschied sich nicht ($p > 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen.

Futterwahlverhalten im Cafeteria-Versuch

Ergebnisse zum Wahlverhalten von Absetzferkeln im Cafeteria-Versuch sind in Tabelle 18 enthalten.

Tab. 18: Futterwahlverhalten von Absetzferkeln (n = 20) im Cafeteria-Versuch

	Trog[1]	VG A	VG B	VG C
Verweildauer [min]	A	1,74	1,34	1,35
	B	1,39	1,41	1,06
	C	1,82[b]	2,18[ab]	2,51[a]
Futterverzehr [g/d]	A	502[a]	369[b]	316[b]
	B	282	253	239
	C	543[b]	552[b]	805[a]

VG, Versuchsgruppe; [1] in den Trögen A, B und C wurde jeweils Futter aus den VG A, B und C angeboten; [a, b] mit $p < 0,05$ signifikante Mittelwertdifferenzen innerhalb einer Zeile

Die Ferkel aller Versuchsgruppen verweilten an dem Trog mit dem Futter mit dem höchsten Met-Gehalt am längsten, was im Gruppenvergleich innerhalb dieser Futtervariante C bei den Ferkeln, die das Futter bereits kannten, gegenüber den sonst an ein Futter mit niedrigem Met-Gehalt adaptierten Tieren besonders stark ausgeprägt war (2,5 vs. 1,8 min; $p < 0,05$). Im Cafeteria-Versuch verzehrten die Ferkel der hinsichtlich des Met-Gehaltes im Futter gegensätzlichen VG A und C jeweils von dem Futter am meisten ($p < 0,05$), welches sie aus der Vorfütterung kannten. Die an ein annähernd bedarfsgerecht mit Met ausgestattetes Futter adaptierten Ferkel der Gruppe B verhielten sich diesbezüglich weitgehend indifferent.

Lebendmassezunahme und Futteraufnahme

Die Entwicklung der LMZ der Absetzferkel aller Versuchsgruppen über neun Versuchswochen in beiden Durchgängen zeigt Abbildung 18.

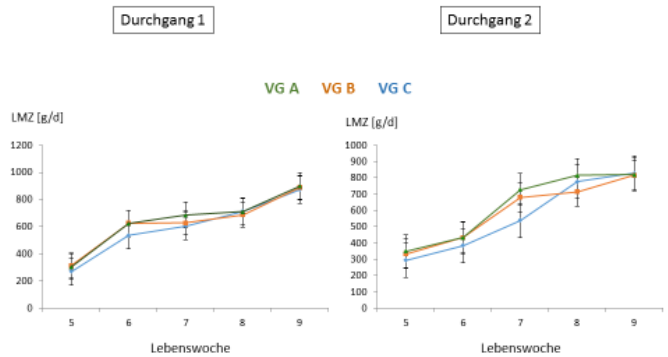


Abb. 18: Entwicklung der LMZ der Ferkel aller Versuchsgruppen in beiden Durchgängen

Während die LMZ der Ferkel aller Gruppen in Durchgang 1 etwa vergleichbar war wurde in Durchgang 2 für die Ferkel der VG C vor allem in Versuchswoche 7 eine geringere LMZ verzeichnet als bei den Ferkeln der VG B und vor allem auch der VG A. Dies war primär auf eine höhere Futteraufnahme der Ferkel in VG A zurückzuführen. Insgesamt waren die Effekte bei männlichen Ferkeln stärker ausgeprägt als bei Weiblichen.

Eine parallele Darstellung der LMZ über die Mastphase der Durchgänge 1 und 2 enthält Abbildung 19.

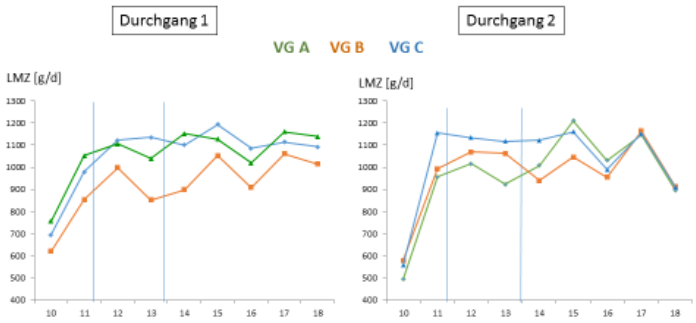


Abb. 19: Entwicklung der LMZ der Mastschweine aller Versuchsgruppen in beiden Durchgängen

Im ersten Durchgang war die LMZ der Mastschweine bei Aufnahme von entweder dem mit Met zu niedrig oder zu hoch ausgestattetem Alleinfutter im Vergleich zu dem annähernd bedarfsgerecht gestalteten Alleinfutter höher. Im zweiten Durchgang wiesen von Versuchswoche 11 bis 14 die an das sehr hoch mit Met ausgestattete Futter adaptierten Schweine der VG C die höchste LMZ auf, mit einer gruppenegalisierenden Kompensation zum Ende der Mast. Kompensatorische Vorgänge waren vor allem seitens der Futteraufnahme zu verzeichnen. Die starke Wechselwirkung zwischen Versuchs-gruppe und Durchgang lässt in diesem Lebendmassebereich keine unabhängige Auswertung zu.

Lebendmasse zum Mastende und Schlachtkörperqualität

Die Lebendmasse der Schweine zum Mastende in beiden Durchgängen ist in Abbildung 20 dargestellt.

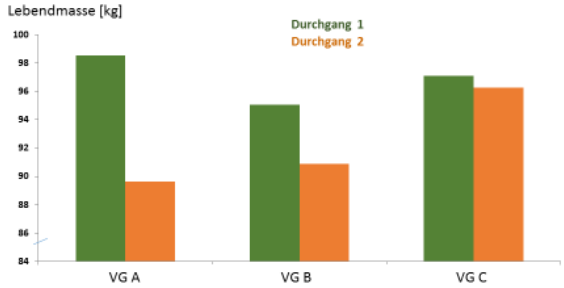
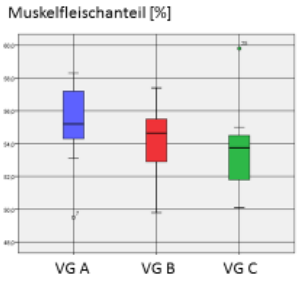


Abb. 20: Mittlere Lebendmasse der Schweine aller Gruppen in beiden Durchgängen zum Mastende

Korrespondierend mit der Entwicklung der LMZ waren die Schweine der VG B im ersten Durchgang zum Schlachtende am Leichtesten. Im zweiten Durchgang nahm die Mastendmasse mit ansteigendem Met-Gehalt im Futter überproportional zu. Auch in Bezug auf diese Variable erlaubt die starke Wechselwirkung zwischen Versuchsgruppe und Durchgang keine verallgemeinerbare Aussage.

Ergebnisse zum Muskelfleischanteil im Schlachtkörper der Mastschweine aus Durchgang 2 sowie zur EUROP-Klassifizierung zeigt Abbildung 21.



EUROP-Klassifizierung

	E	U	R	O	P
VG A	5	3	1	0	0
VG B	5	4	1	0	0
VG C	2	8	0	0	0

Abb. 21: Ergebnisse zum Muskelfleischanteil im Schlachtkörper der Mastschweine sowie zur EUROP-Klassifizierung (Durchgang 2)

Der Muskelfleischanteil der Mastschweine in Durchgang 2 nahm mit zunehmendem Met-Gehalt im Futter ab, dies allerdings nicht signifikant (p = 0,442). Die EUROP-Klassifizierung korrespondierte entsprechend.

Knochenmarker

Zur Beurteilung des Knochenstoffwechsles wurde im Blutserum der Mastschweine zum Zeitpunkt der Schlachtung Osteoclacin (Knochenaufbau) und ß-ClossLaps (Knochenresorption) bestimmt (Abb. 22).

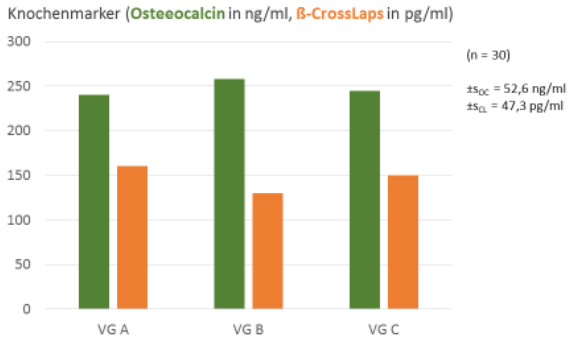


Abb. 22: Osteocalcin und ß-CrossLaps im Blutserum der Mastschweine aller Versuchsgruppen zum Zeitpunkt der Schlachtung

Im Hinblick auf die gemessenen Knochenmarker lag kein signifikanter Effekt der Versuchsgruppe vor. Allenfalls war in der annähernd bedarfsgerecht mit Met versorgten Gruppe Osteocalcin etwa höher und ß-CrossLaps etwas niedriger konzentriert als in den beiden anderen Gruppen.

Verhalten und Stresskompensation

Die *Videodokumentation des Verhaltens der Ferkel* zeigte, dass die aktiven im Vergleich zu den passiven Ferkel der VG A tendenziell mehr Zeit mit der Aufnahme von Futter verbrachten. Sowohl aktive als auch passive Ferkel der VG A knabberten zu einem höheren Zeitanteil an den Käfigstäben als die Ferkel der VG B und C beider Temperamentsgruppen.

In der Ferkelphase (Durchgang 2) hatte zum Zeitpunkt des *Verhaltens-Challenge* weder die Versuchsgruppe ($p = 0{,}685$) noch das Temperament (aktiv oder passiv; $p = 0{,}707$) der Ferkel einen Effekt auf den ART-Score. Die Herzfrequenzvariabilität, hier ausgedrückt als RMSSD (Root Mean Square of Successive Differences = Quadratwurzel des Mittelwertes der Summe aller quadrierten Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen) und damit Indikator für die Kurzzeitvariabilität des Parasympathikus, war durch das Temperament der Absetzferkel ($p = 0{,}821$) wie auch durch den Met-Gehalt des Alleinfutters ($p = 0{,}468$) gleichermaßen unbeeinflusst. In der Mastphase (Durchgang 2) zeigte der ART-Score während des Challenges bei den laut Backtest aktiven Tieren ein entspanntes, interessiertes aber wenig lautgebendes Verhalten an, während die als passiv vorgetesteten Schweine eher lebhaft und lautgebend reagierten ($p < 0{,}001$). Die RMSSD war hinsichtlich eines Temperamentsunterschiedes indifferent ($p = 0{,}392$). Der ART-Score ließ währen des Challenges keine Unterscheidung zwischen den VG zu ($p = 0{,}283$), gemäß RMSSD war der Parasympathikus in der Gruppe mit dem am höchsten mit Met ausgestatteten Futter am geringsten aktiviert, mit signifikanten Unterschieden ($p < 0{,}001$) zu den beiden anderen Versuchsgruppen. Bei gesonderter Betrachtung der Hauptfaktoren Met-Versorgung und Temperament in beiden Durchgängen wurde erkennbar, dass die annähernd bedarfsgerecht mit Met versorgten, aktiven Mastschweine im Vergleich zu den beiden anderen VG den höchsten ART-Score aufwiesen ($p = 0{,}002$; Durchgang 2), die passiven Mastschweine dagegen den Niedrigsten (in beiden Durchgängen, nur in Durchgang 1 mit $p = 0{,}028$ signifikant).

Genexpression

Mikroarray-Analysen aus von den Mastschweinen zum Zeitpunkt der Schlachtung isolierten Leukozyten (PBMCs) durch TP 2.1 zeigen, dass von den 32.804 Sonden-Sets für mRNA`s dv. 27.624 einem Gen zugeordnet werden konnten. Mit jeweils $p < 0{,}01$ war für 149 Gene ein Einfluss der Versuchsgruppe (Met-Stufe), für 225 Gene ein Einfluss des Verhaltens (Temperaments-sortierung gemäß Backtest) und für 165 eine Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren signifikant. Unter den regulierten Genen befinden sich auch solche zur Regulation von DNA-Methyl-Transferasen, womit ein Bezug zur epigenetischen Regulationsebene hergestellt sein dürfte. Wie eingangs erwähnt werden diese Untersuchungen im Rahmen der PHÄNOMICS Nachwuchs-Forschergruppe „Phänotypisierung des Tierwohls“ fortgesetzt.

2.2.4.4 Schlussfolgerungen

Die relativ zu den Versorgungsempfehlungen nach unten und oben deutliche Abstufung der Versorgung wachsender Schweine mit der essentiellen, proteinogenen Aminosäure Met lässt in Bezug auf alle hier getesteten Kriterien (zootechnische Parameter, Futteraufnahme- und Futterwahl-verhalten, Lebendmassezunahme, Futterverwertung, Schlachtergebnis, Verhalten/Stresskompen-

sation in täglicher Routine und in einer Stresssituation, Knochenstoffwechsel, Genexpression) signifikante oder zumindest tendenzielle Effekte erkennen, teils kompensiert durch ein angepasstes Futteraufnahmeverhalten und Modifikation durch das gemäß Backtest vorsortierte Verhalten/ Temperament der Tiere. Im Hinblick auf die (epi)genetische Elastizität ist besonders herauszustellen, dass sowohl ein signifikanter Fütterungseinfluss als auch ein ebensolcher Effekt des Verhaltens/Temperaments vorliegt und weiterhin statistisch gesicherte Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Hauptfaktoren auftraten. In Bezug auf Letzteres werden die Analysen und Auswertungen derzeit noch fortgesetzt.

2.2.5 Validierung der ‚Multi-Criteria-Analyse' (TP 5.5)

2.2.5.1 Zielformulierung und abgeleitete Fragestellungen

Das Ziel dieses Teilprojektes bestand zum einen in der Überprüfung des im Teilprojekt TP 5.4 entwickelten Bewertungssystems bezüglich seiner Umsetzbarkeit unter Feldbedingungen und zum anderen in der Abschätzung der Aussagekraft des Bewertungssystems hinsichtlich der Beurteilung der Tiergerechtheit von bestimmten Haltungssystemen. Aus den Zielen sind folgende zu beantwortende Fragestellungen abgeleitet:

a) Wie ist der Multi-Kriterien-Katalog in der Praxis umzusetzen?

b) Sind die Ergebnisse vergleichbar mit den vorangegangenen Untersuchungen bezüglich der identifizierten Biosignaturen die mit dem Verhalten assoziiert sind?

c) In wieweit lassen sich verhaltensorientierte Biosignaturen mit der Einschätzung eines Herdenmanagers in Übereinstimmung bringen?

d) Ist eine Beurteilung verhaltensorientierter Merkmale besser geeignet als die Einschätzung eines Herdenmanagers?

d) Können Metabolomdaten eine Möglichkeit bieten, schnelle bzw. zielgerichtete Aussagen über das Tierwohl in der Praxis abzuleiten?

2.2.5.2 Zielerreichung, Zeitplan und chronologische Ablaufübersicht

Die Verzögerungen zum ursprünglichen Zeitplan ergaben sich aus den Verzögerungen der Bearbeitung der relevanten vorgelagerten Teilprojekte in VP 1,2,3 und 4. TP 5.5 war zwingend auf die Vorarbeiten und Daten zur Bearbeitung der eigenen Fragestellungen angewiesen. Erst mit der Bereitstellung der Daten aus diesen VP´s konnte mit der Durchführung begonnen werden. Das Teilprojekt 5.5 startete letztendlich im Februar 2013. Am 27. März 2013 wurde von TP 5.4 in Kiel den Multi-Kriterien-Katalog vorgestellt. Dieser basiert nahezu komplett auf dem Animal Welfare Quality® Assessment Protokoll (AWAP) für Schweine, bietet aber durch die Anwendung von Macbeth und Choquet Integral die Möglichkeit zusätzliche Parameter wie bspw. Biosignaturen bzw. Metabolomdaten mit einzubeziehen. Da in dem vorangegangen TP 5.4 bereits das AWAP auf Praxisbetrieben für Schweine angewendet wurde, sollte nunmehr in TP 5.5 das AWAP für Rinder durchgeführt werden.

Zur Anwendung des AWAP bedurfte es eines Trainings um a) gleiche Voraussetzungen für alle Beurteiler zu generieren und b) weil der komplexe Inhalt des Protokolls ohne entsprechende Erklärungen und Übungen die Gefahr einer fehlerhaften Umsetzung seitens der Durchführenden mit sich führte. Im deutschsprachigen Raum wurde zurzeit nur von Prof. Winckler (BOKU Wien) ein entsprechendes Training zur Beurteilung der Milchkuhhaltung angeboten. Aufgrund dieser Limitierung und den damit verbundenen terminlichen Engpässen war es nicht möglich, vor Februar 2014 das

Training zu absolvieren. Das Training fand letztlich vom 17. Februar 2014 bis zum 19. Februar 2014 statt. In diesem Zusammenhang wurde der erste Praxisbetrieb (Betrieb 1) hinsichtlich des Wohlbefindens der Milchkühe auf Ebene des Gesamtbetriebes, als auch auf Gruppenebene mit Hilfe des AWAP beurteilt. Ebenso wurden in diesem Kontext Kandidatentiere identifiziert, die entweder besonders gut respektive schlecht an die entsprechenden Haltungsumgebungen angepasst waren (klinische Beurteilung, agonistisches Verhalten, Abliegeverhalten usw.).

In den nachfolgenden Untersuchungen sollte neben der Durchführung des AWAP, vermehrt die Möglichkeit in den Fokus gestellt werden, zusätzliche Parameter mit den Erhebungen aus dem AWAP zu vergleichen. Ebenso war es notwendig bei einer entsprechenden Untersuchung zu überprüfen, ob die Erhebungen mittels AWAP auch auf Ebene des Einzeltieres anwendbar sind, um entsprechend existierende Biosignaturen mit den Ergebnissen des AWAP zu vergleichen, um diese möglicherweise in letzter Konsequenz in die Untersuchung implementieren zu können. Im nächsten Versuchsansatz wurde deshalb auf dem zweiten Betrieb (Betrieb 2) das AWAP angewendet und sowohl den gesamten Stall, einzelne Gruppen, als auch 12 zufällig ausgewählte Einzeltiere einer Gruppe betrachtet.

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob Meatbolomdaten eine Möglichkeit bieten, schnelle bzw. zielgerichtete Aussagen über das Tierwohl in der Praxis abzuleiten, wurde Betrieb 3 ausgewählt. Für Tiere aus diesem Betrieb wurden in TP 2.4 Temperamentsdaten und in TP. 4.2 Metabolomdaten erhoben. Ergänzend wurden via AWAP Protokoll der Betrieb sowie die noch im Betrieb befindlichen, bereits damals (TP 2.4) untersuchten Tiere begutachtet.

Darüber hinaus ergab sich die Notwendigkeit einen zusätzlichen Vergleich zwischen Metabolomdaten und der Einschätzung eines Herdenmanagers anzustreben. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob die tägliche Arbeit mit den Tieren eine Einschätzung erlaubt, die Tiere als „auffällig“ und „unauffällig“ zu klassifizieren und ob dieses sich ebenso wie die durchgeführten Verhaltenstests der vorgelagerten TP´s in Unterschieden im Metabolomprofil zeigt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob ein durchgeführter Verhaltenstest an Aufzuchtkälbern ebenfalls Unterschiede im Metabolomprofil zeigt.

2.2.5.3. Tiere, Material und Methoden

Zur Einschätzung des Wohlbefindens kam das Animal Welfare Quality® Assessment Protokoll (AWAP) für Rinder zur Anwendung. Gemäß den Vorgaben aus TP 5.4, die das gleiche Protokoll für Schweine als Grundlage nutzten, war in TP 5.5 das Ziel dieses Protokoll zur Rinderbeurteilung auf Praxisbetrieben zu testen. Insgesamt wurden auf 3 verschiedenen Milchviehbetrieben 256 Kühe via AWAP beurteilt. Das AWAP ist mit der Intention entwickelt worden möglichst umfassend, aber auch möglichst schnell das Wohlbefinden von Tieren auf Stall- bzw. Betriebsebene zu erfassen. Dieses Spannungsfeld äußert sich darin, dass für die Erfassung eines ganzen Betriebes mit einer Herdengröße von über 200 Tieren ein kompletter Arbeitstag eingeplant werden sollte, um das gesamte Protokoll anwenden zu können.

Das Protokoll gibt 4 verschiedene Prinzipien vor, die seitens des Herdenmanagements eingehalten werden sollten, um möglichst gute Ergebnisse im Hinblick auf das Tierwohl zu erhalten. Diese 4 Prinzipien sind gute Fütterung, gute Haltung, gute Gesundheit und angepasstes (tiergerechtes) Verhalten (Tab. 19).

Tab. 19: Übersicht der erhobenen Parameter im Rahmen des AWAP

Prinzip	Kategorie	Parameter
Fütterung	Abwesenheit von Hunger	Körperkondition (BCS)
	Abwesenheit von anhaltendem Durst	Wasserversorgung
		→ Sauberkeit
		→ Wasserfluss
		→ Funktionsfähigkeit der Tränken
Haltung	Liegekomfort	Zeitbedarf Abliegen
		Kollision mit Stalleinrichtung beim Abliegen
		Lage in Liegebox
		Eutersauberkeit
		Sauberkeit Flanken und Gliedmaßen
	Bewegungsfreiheit	Anbindehaltung
		Austrieb
		Weide
Gesundheit	Verletzungen	Lahmheit
		Hautirritationen
	Krankheiten	Husten, Augen-/Nasensekret, Durchfall, Festliegen, Zellzahl, Mortalitätrate, Geburtsverläufe
	Schmerz seitens Management	Enthornen, Schwanz kupieren
Verhalten	Sozialverhalten	Agonistisches Verhalten
	Mensch-Tier-Beziehung	Vermeidungsdistanz
	Gemütslage	Qualitative behaviour assessment (QBA)

Dabei untergliedert sich jedes der 4 Prinzipien in verschiedene Kategorien die jeweils durch die Erfassung dazugehöriger Parameter (n=39) über die Nutzung von vorgegebenen Splinefunktionen mit einem Score bewertet wurden (0=schlechtester, 100=bester) (Abb. 23), der letztlich in einer Kategorisierung mündet (Abb. 24).

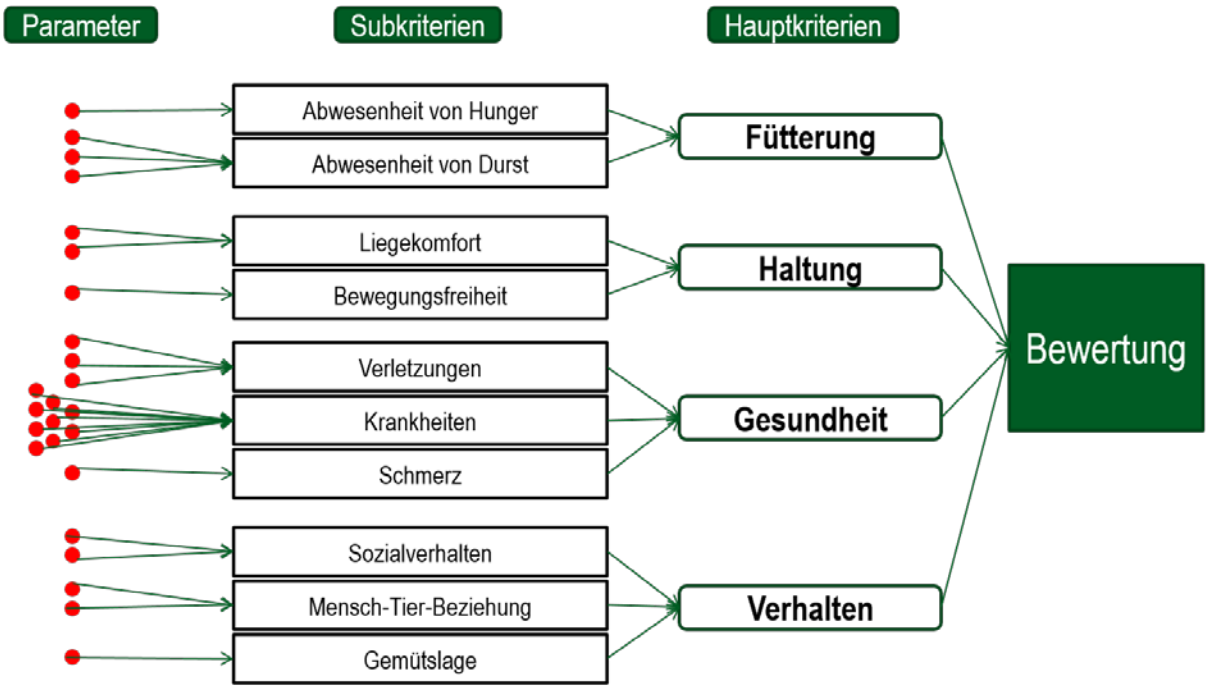


Abb. 23: Übersicht des Bewertungsschemas

Kategorie	Score	definiert als
exzellent	> 80	Wohlbefinden der Tiere auf höchstem Niveau
fortgeschritten	55 - 80	Wohlbefinden der Tiere ist gut
akzeptabel	21 - 54	Wohlbefinden der Tiere entspricht minimalen Anforderungen oder höher
nicht klassifiziert	< 20	Wohlbefinden der Tiere ist gering und damit unakzeptabel

Abb. 24: Einschätzung der erzielten Scores

Für weitergehende Informationen sei an dieser Stelle auf das Protokoll verwiesen (http://www.welfarequalitynetwork.net/network/45848/7/0/40).

Zusätzlich zum AWAP wurden Metabolomdaten von 20 verschiedenen Kühen der Rasse Deutsche Holstein untersucht. Dabei wurden seitens des Herdenmanagers Tiere ausgewählt, die „auffälliges“ (n=10) oder „unauffälliges“ (n=10) Verhalten zeigten. Unter „auffälligem“ Verhalten fiel dabei insbesondere das Ausschlagen beim Vormelken bzw. Dippen, das Abschlagen vom Melkgeschirr oder das Ausbrechen unter Zwangssituationen wie Maßnahmen zur Zuchthygiene, dem Klauen schneiden oder anderen etwaigen Behandlungen. Dafür wurden durch einen Tierarzt mit dem

Blutentnahmesystem Kabevette® (Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) Blutproben aus der Schwanzvene entnommen. Diese wurden dann bei 2700 rcf 25 min zentrifugiert und 500 µl aus dem Überstand abpipettiert bei -80 °C gelagert und gesammelt zu Metabolomic Discoveries (Potsdam, Deutschland) gesendet und dort analysiert.

Parallel zu einem Kälberfütterungsversuch wurden ebenso Kälber (Deutsche Holstein) bezüglich einer Temperamentseinschätzung untersucht. Hierzu wurden die Tiere am 14. Lebenstag mit einem roten Treibebrett an eine Seite der Umzäunung ihrer Kälberiglus durch eine Person leicht fixiert und 10 min gefilmt. Über die Ermittlung bzw. Auszählung von Verhaltensauffälligkeiten wie Kopfschlagen, Ausschlagen mit den Extremitäten oder dem Schwanz, Trippeln, Harnen, Kotabsatz oder auch Vokalisation wurden die Kälber in Kategorien eingeteilt. Dabei kam das in Tabelle 20 aufgeführte Bewertungsschema zur Anwendung.

Tab.20: Bewertungsschema zur Gruppierung der Kälber

Verhalten	Faktor
Kopfschlagen	5
Ausschlagen	5
Trippeln	1
Vokalisation	1
Schwanzschlagen	1
Miktion	1
Faeces	1

Kälber unter einem Score von 70 wurden als „ruhig“ und respektive über 70 als „aktiv“ eingestuft („Total Score“). Ebenso wurde eine weitere Unterteilung von Kälbern vorgenommen, die entweder in den ersten oder in den zweiten 5 min eine höhere Aktivität zeigten. Dafür wurde der Quotient aus den akkumulierten Scores der ersten und zweiten 5 min gebildet. Bei der „Relation A“ wurde alle Kälber mit einem Quotienten über 2 dem Code „aktiv1“ und alle kleiner gleich 2 dem Code „aktiv2“ zugewiesen. Die „Relation B“ gliedert sich wie auch „Relation A“ in Kälber, die entweder in den ersten oder zweiten 5 min eine höhere Aktivität zeigten. Alle Kälber mit einem Aktivitätsquotienten über 1 wurden dem Code „1aktiv“ und alle unter 1 dem Code „2aktiv“ zugeordnet. Von allen untersuchten Kälbern wurden am 14. Lebenstag Blutproben entnommen und ebenso wie die Blutproben der Kühe behandelt.

Metabolomdaten

Von der Firma Metabolomic Discoveries (Potsdam, Deutschland) wurden insgesamt 56 Blutproben von Kühen (n=20) und Kälbern (n=36) der Rasse Deutsche Holstein analysiert. Hier wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Der erste bezog sich auf die Kuhproben und vergleicht die Metabolomdaten von „auffälligen“ und „unauffälligen“ Kühen.

Bei den Kälberproben wurden Proben von Kälbern untersucht die „aktiv“ oder „ruhig“ eingestuft wurden. Zusätzlich wurden „aktiv1“ und „aktiv2“ bzw. „1aktiv“ und „2aktiv“ nach den bereits oben erläuterten Quotienten verglichen.

Außerdem wurden Parameter erfasst und berücksichtigt, die einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben könnten: die Bearbeitungszeit (die Zeit von der Probenahme über Transport und Zentrifugation bis hin zur Lagerung bei -80 °C) und die Färbung der Probe nach dem Zentrifugieren. In der Kälbergruppe wurde zusätzlich eine ANOVA für die Faktoren Geschlecht und Fütterung durchgeführt, da hier überlagernde Effekte hervorgerufen durch die unterschiedliche Fütterung zu erwarten waren.

Die eigentliche Analyse der Blutproben war eine non-targeted Metabolit Profilinganalyse in denen eine GC-MS und eine LC-QTOF/MS durchgeführt wurden. Hierbei handelt es sich um Methoden in denen Metabolite in einem Bereich von 50-1700 Da mit einer Genauigkeit von 1-2 ppm mit einer Auflösung von Masse/ΔMasse = 40000 stattfinden.

Für die graphische Darstellung wurden die Daten in eine Matrix eine sogenannte Heatmap überführt. Dabei sind die Metabolite auf den Zeilen und die Proben in den Spalten dargestellt. Ebenso wurde die mittlere Abundanz mit einem Farbcode hinterlegt (Abb. 25)

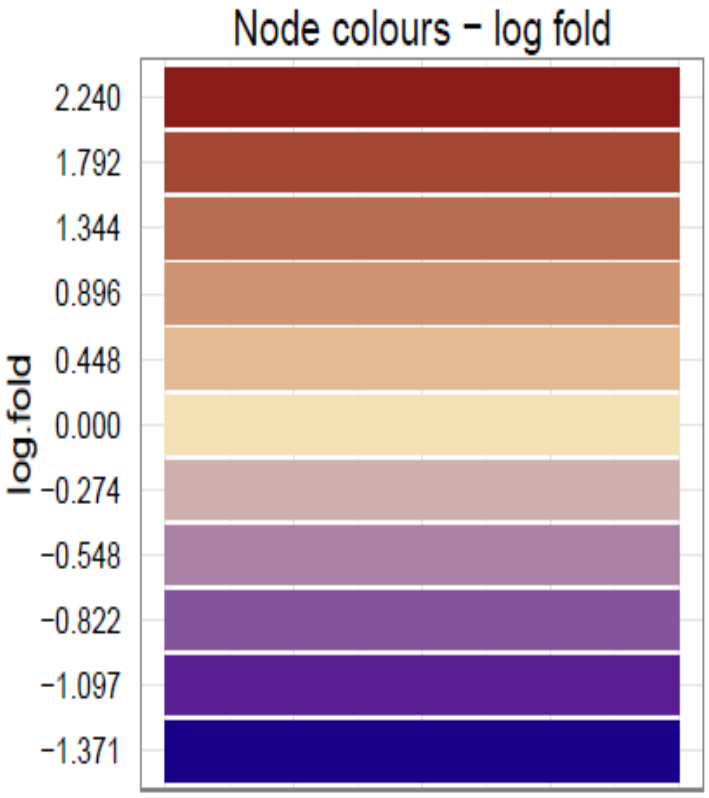


Abb. 25

2.2.5.4. Ergebnisse

Alle drei Betriebe hatten eine ähnliche Herdengröße und Laufstallhaltung. Damit war eine gute Möglichkeit gegeben, die Betriebe hinsichtlich des Tierwohls zu vergleichen. Unterschiede bezüglich des Protokolls waren vor allem im Alter der Ställe (teilweise Neubauten), in der Anlage der Liegeboxen (Bugschwelle, Länge, Breite) und der verwendeten Tränken zu verzeichnen. Ebenso ergaben sich Unterschiede hinsichtlich des Ernährungszustandes (Anmerkung: das AWAP erfasst nur Tiere mit schlechter Körperkondition als negativ), der Sauberkeit, der klinischen Auffälligkeiten und im Sozialverhalten.

In Tabelle 21 sind die unterschiedlichen Bewertungen, sowohl für den gesamten Betrieb, auf Gruppenebene und für Betrieb 2 auch auf Einzeltierebene, für alle getesteten Betriebe aufgeführt.

Tab. 21: Scores der einzelnen Prinzipen und Gesamteinschätzung

Ebene	Anzahl	Fütterung	Haltung	Gesundheit	Verhalten	Einschätzung
Betrieb 1	81	80,53	47,35	40,63	22,98	akzeptabel
Leistungsgruppe 1	16	72,26	59,11	39,07	22,52	fortgeschritten
Leistungsgruppe 2	16	99,99	56,05	37,74	21,48	fortgeschritten
Altmelker	15	99,99	60,40	33,33	23,02	fortgeschritten
Jungkühe	15	99,99	46,09	44,13	21,95	akzeptabel
Frischmelker, Trockensteher, Vorbereiter	19	58,75	59,97	42,33	23,15	fortgeschritten
Betrieb 2	80	92,75	60,40	30,47	26,07	fortgeschritten
Altkühe	21	99,99	53,85	25,19	26,48	fortgeschritten
Jungkühe	21	99,99	62,95	34,54	26,12	fortgeschritten
Kühe <30l	13	99,99	67,52	35,08	24,74	fortgeschritten
Starter	12	64,87	53,85	32,48	27,35	fortgeschritten
Lahme Kühe	4	99,99	65,43	22,19	26,29	fortgeschritten
Euterkranke	1	99,99	69,36	37,69	22,77	fortgeschritten
Vorbereiter	1	99,99	82,75	9,69	38,53	akzeptabel
Trockensteher	7	99,99	73,99	34,73	24,10	fortgeschritten
Kuh 1	1	27,00	77,01	34,54	21,33	akzeptabel
Kuh 2	1	99,99	65,43	29,20	15,33	fortgeschritten
Kuh 3	1	99,99	66,66	37,69	28,93	fortgeschritten
Kuh 4	1	27,00	86,27	37,69	21,01	akzeptabel

Kuh 5	1	99,99	62,95	39,76	32,50	fortgeschritten
Kuh 6	1	99,99	86,27	18,90	29,46	fortgeschritten
Kuh 7	1	99,99	70,92	37,69	20,11	fortgeschritten
Kuh 8	1	99,99	86,27	39,76	38,65	fortgeschritten
Kuh 9	1	99,99	86,27	39,76	33,77	fortgeschritten
Kuh 10	1	99,99	86,27	37,69	25,23	fortgeschritten
Kuh 11	1	99,99	86,27	39,76	47,66	fortgeschritten
Kuh 12	1	99,99	86,27	37,69	28,37	fortgeschritten
Betrieb 3	95	34,35	53,85	30,60	10,50	akzeptabel
Gruppe 1	16	40,16	65,43	26,39	19,41	akzeptabel
Gruppe 2	16	32,99	53,85	24,16	20,52	akzeptabel
Gruppe 3	16	40,16	65,43	31,69	17,36	akzeptabel
Gruppe 4	8	40,16	65,43	31,68	15,85	akzeptabel
Gruppe 5	11	33,74	53,85	25,20	18,10	akzeptabel
Gruppe 6	2	17,08	67,52	34,92	8,78	akzeptabel
Gruppe 7a	10	30,79	47,35	36,68	12,33	akzeptabel
Gruppe 7n	7	32,60	70,92	28,80	12,71	akzeptabel
Gruppe 8	1	40,16	70,92	34,92	17,78	akzeptabel
Gruppe 21	6	40,16	65,43	33,90	16,86	akzeptabel
Gruppe E	2	17,08	61,26	34,92	10,28	akzeptabel

In Betrieb 1 wurde in der Leistungsgruppe 1 eine Kuh beobachtet deren Abliegevorgang über 26 sek dauerte. Auf dem gleichen Betrieb lagen in der Leistungsgruppe 2, den Frischmelkern, den Trockenstehern und den Vorbereitern einige Kühe ganz bzw. teilweise außerhalb der Liegeboxen. Bei den Altmelkern fielen einige der untersuchten Tiere mit Durchfall auf. Bei den Jungkühen kollidierten einige Tiere während des Abliegens mit der Stalleinrichtung. Die einzelnen Gruppen sind von diesen Fällen, ausgenommen den Jungkühen, nicht negativ von ihrer Beurteilung betroffen, allerdings führt die Akkumulation der beobachteten negativen Einflussfaktoren auf Betriebsebene zu einer Veränderung der Einschätzung auf akzeptabel. Bereits hier deutet sich die Schwierigkeit an, dass Protokoll auch auf Gruppenebene verwenden zu wollen. Die Auswertung des Protokolls setzt klare Stichprobengrößen voraus. Genau auf diese Stichprobenumfänge ist das dahinterliegende Auswertungsschema ausgerichtet. Nichtsdestotrotz kann auch mit Hilfe des Protokolls auf Gruppenebene eine entsprechende Beurteilung vorgenommen werden. Möglicherweise ist es aber ratsam zukünftig eine Anpassung der Auswertung auf den gegebenen Stichprobenumfang vorzunehmen.

In Betrieb 3 waren noch 44 der 86 Kühe die bereits im TP 2.4 über einen Verhaltenstest kategorisiert wurden. Dieses Temperamentscoring nach GRANDIN 1993 umfasst 1 = ruhig, keine Bewegung; 2 = etwas unruhig; 3 = sich winden, manchmal wackelt der Fangstand; 4 = kontinuierliche, sehr kräftige Bewegungen mit Wackeln des Fangstands; 5 = aufsteigen, verdrehen des Körpers mit heftigem Kampf.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des AWAP und den vergebenen Scores in TP 2.4 hergestellt werden. Das lag möglicherweise an der Tatsache, dass die noch im Betrieb befindlichen Tiere lediglich Scores von 1 bis 3 aufwiesen und lässt vermuten, dass Tiere mit auffälligem Verhalten bereits aus dem Betrieb ausgeschieden waren.

Die Abbildung 26 zeigt eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Kuhproben und umfasst 23,2 % aller Varianzen innerhalb dieser Stichprobe. Die Proben der „auffälligen“ Kühe sind vorwiegend im linken unteren Teil und die „unauffälligen“ im rechten oberen Teil der Abbildung positioniert dennoch können die beiden analysierten Gruppen „auffällig“ und „unauffällig“ nicht klar voneinander getrennt werden (Abb.26).

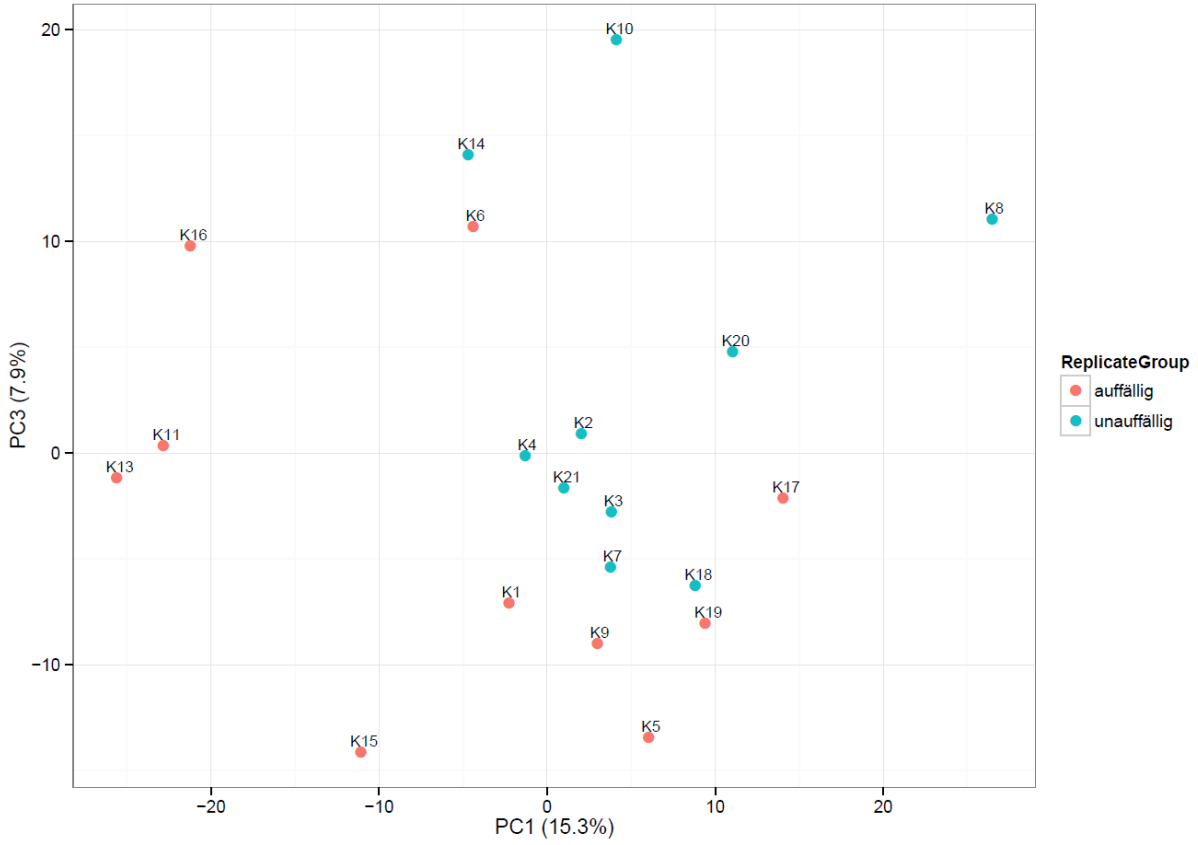


Abb. 26: PCA aller Kuhproben

Allerdings offenbarte die Differentialanalyse insgesamt 93 signifikant unterschiedliche Metabolite ($p<0,05$) zwischen den Gruppen „auffällig“ und „unauffällig“, die anhand einer Heatmap visualisiert wurden. (Abb. 27).

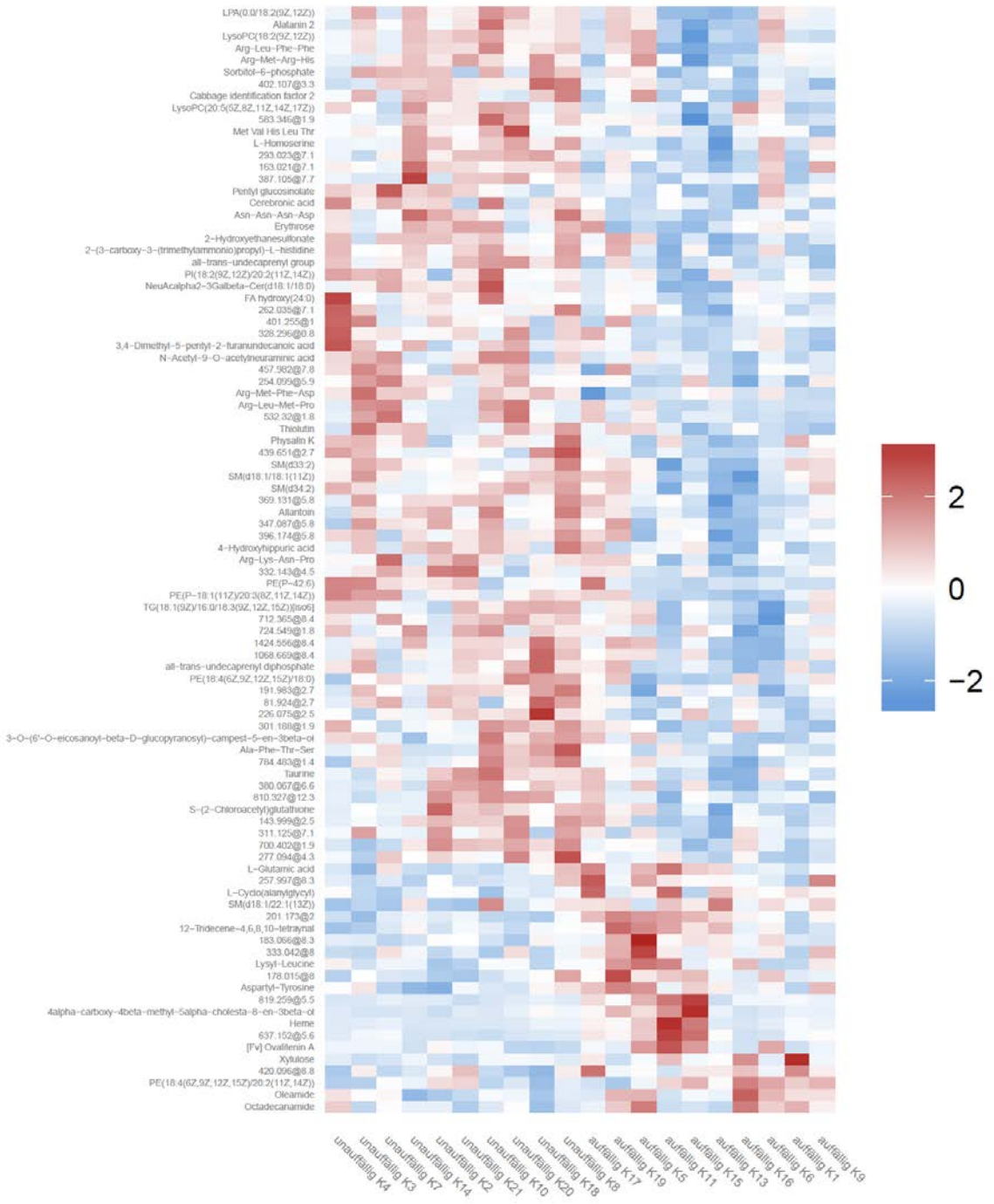


Abb. 27 Heatmap der unterschiedlichen Metaboliten der Kuhproben

Jedoch muss dabei konstatiert werden, dass es sich hierbei um nominal signifikante Unterschiede handelt, da für multiple Tests der Stichprobenumfang als auch die Extreme zwischen dem beobachteten Verhalten zu gering ausfielen.

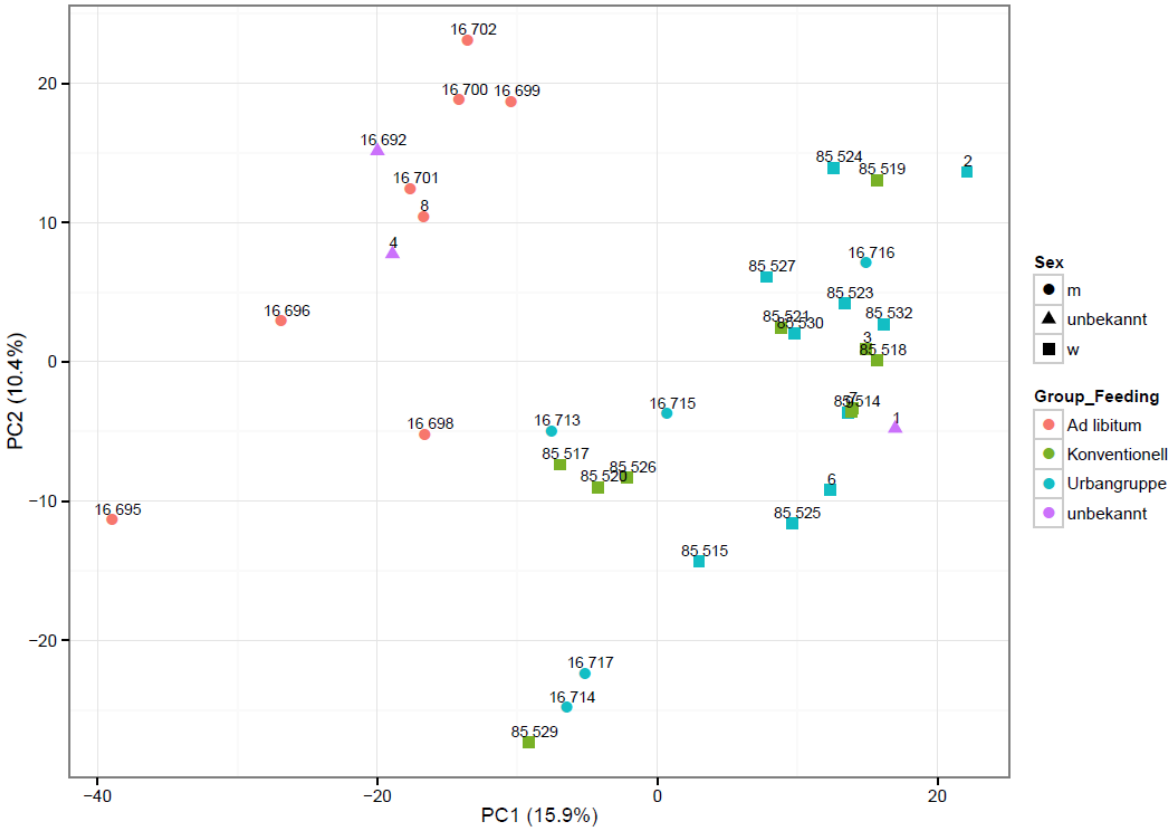


Abb. 28: PCA aller Kälberproben mit den Faktoren „Geschlecht“ und „Fütterungsgruppe“

Die PCA der Kälberproben zeigt klar, dass die Kombination aus „Fütterung“ und „Geschlecht“ den größten Einfluss auf die Varianz innerhalb der Metaboliten hat (Abb. 28). Hingegen zeigt ein Vergleich über den Faktor „Total Score“ nur geringe Erklärung für die Varianz. So das die beiden Gruppen „aktiv“ und „ruhig“ nicht klar voneinander unterschieden werden können (Abb. 29).

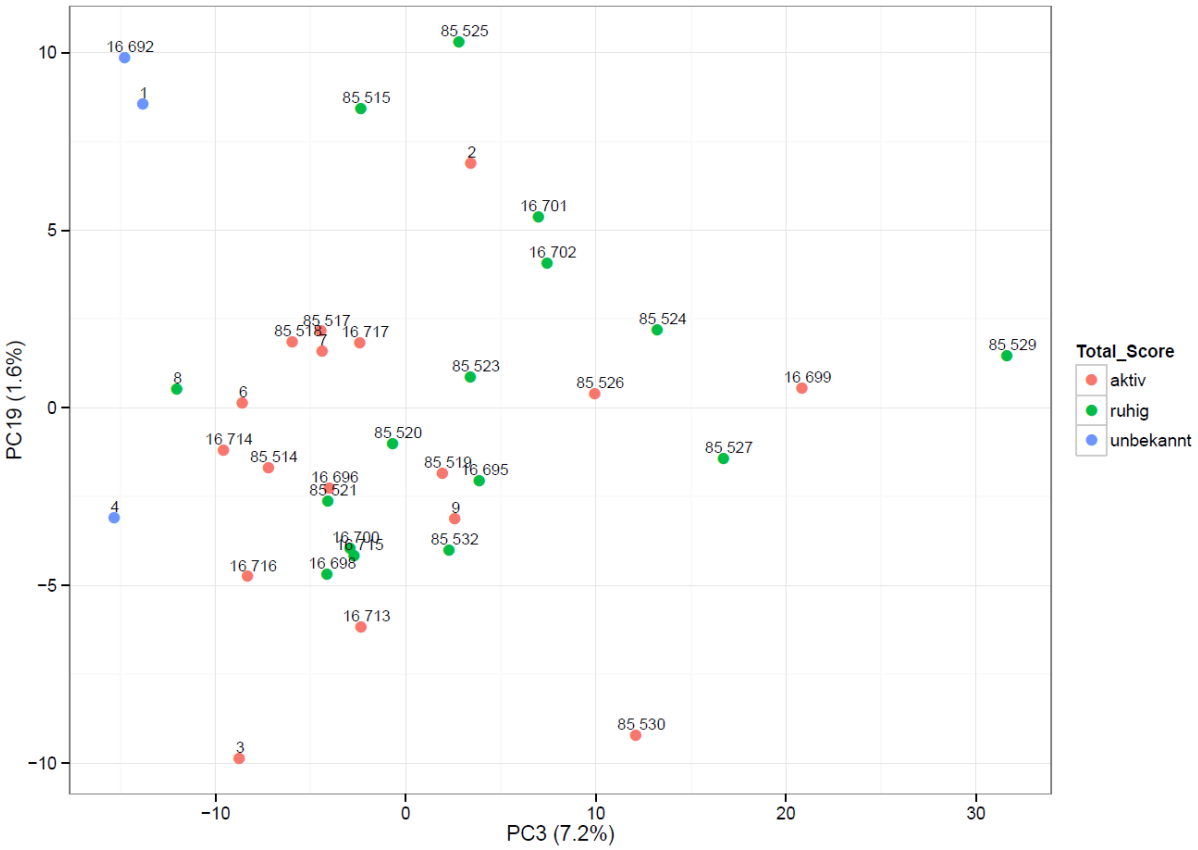


Abb. 29: PCA aller Kälberproben mit dem Faktor „Total Score

Auch der Faktor „Relation A“ induziert keine Varianz, die eine Separation der beiden Gruppen „aktiv1“ und „aktiv2“ ermöglicht. Nichtsdestotrotz sind die Proben aus „aktiv1“ eher im oberen linken Abschnitt und die aus „aktiv2“ eher im unteren rechten Abschnitt der PCA zu finden (Abb. 30)

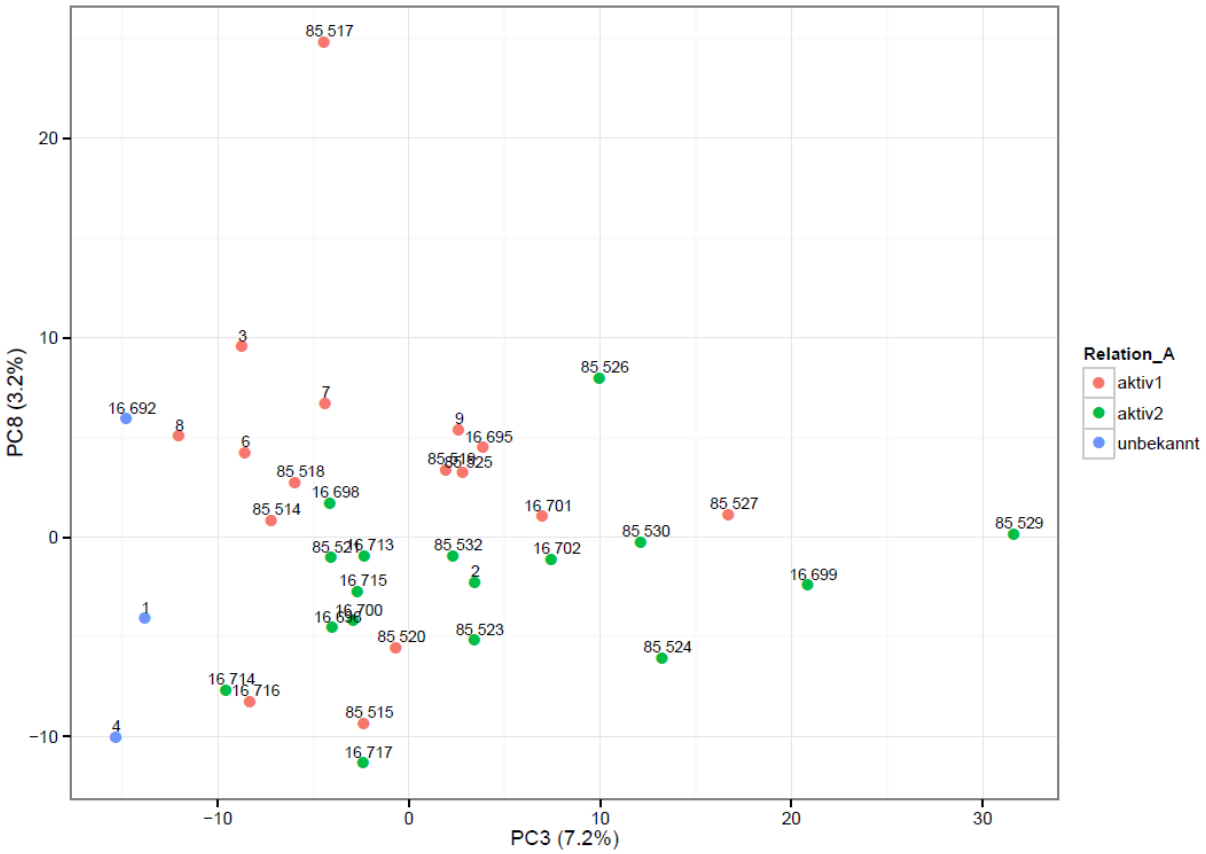


Abb. 30: PCA aller Kälberproben mit dem Faktor „Relation A“

Abbildung 31 zeigt die gleiche PCA wie Abbildung 30, aber die Proben sind nach dem Faktor „Relation B“ geordnet. Auch hier zeigte sich keine klare Differenzierung zwischen den Kälbern. Wobei mehrere Proben aus „1aktiv“ im oberen Abschnitt und Proben aus „2aktiv“ eher im unteren Teil zu beobachten sind.

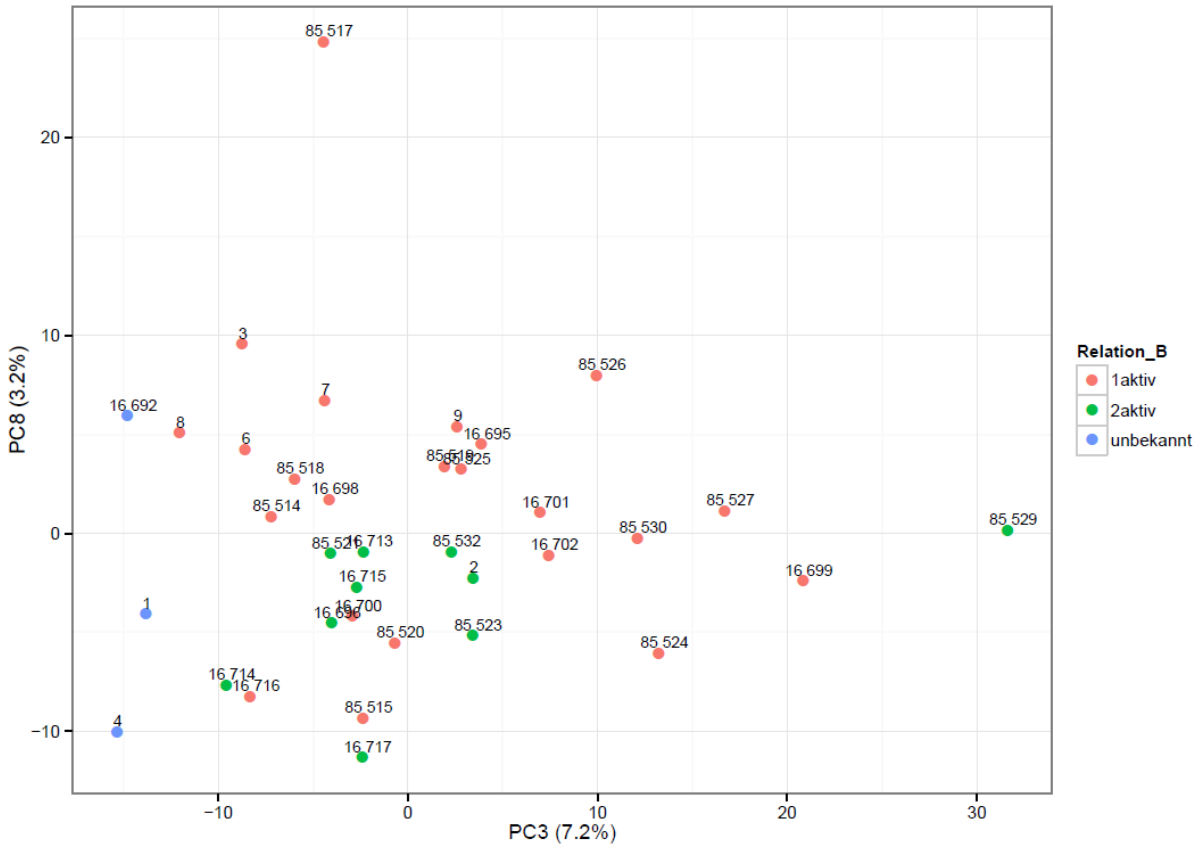


Abb. 31: PCA aller Kälberproben mit dem Faktor „Relation B“

Die Differentialanalysen zeigten 111 signifikant unterschiedliche Metabolite zwischen den Gruppen „aktiv“ und „ruhig“ des Faktors „Total Score“, 71 signifikante Verschiebungen zwischen den Gruppen „aktiv1“ und „aktiv2“ des Faktors „Relation A“ und 80 signifikante Wechsel zwischen „1aktiv“ und „2aktiv“ für den Faktor „Relation B“.

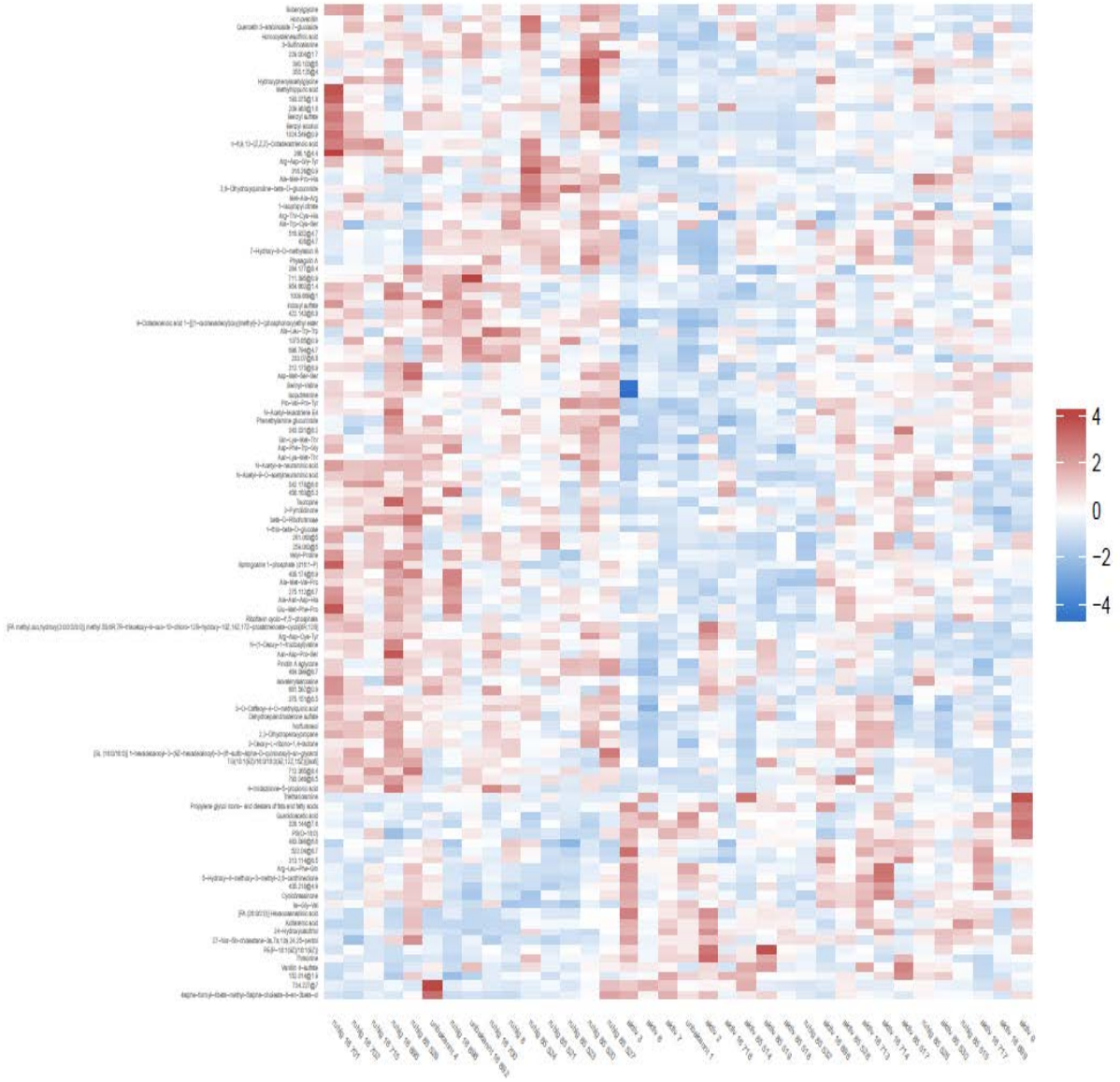


Abb. 32: Heatmap der signifikant verschiedenen Metabolite des Faktors „Total Score“

Die Differenzierung zwischen den Gruppen fällt hier nicht so eindeutig aus wie bei den Kuhproben da der Verhaltenstest nicht nur Extreme sondern auch Zwischenschritte erfasste. Auf eine Darstellung der Heatmaps von „Relation A“ und „Relation B“ wird an dieser Stelle verzichtet, da die Unterschiede kaum anschaulich zu identifizieren waren.

2.2.5.5. Schlussfolgerungen

Bei der Bewertung des Tierwohls handelt es sich um eine hoch komplexe Fragestellung, bei der verschiedene Aspekte berücksichtigt werden müssen.

Das umfangreiche AWAP Protokoll war für alle Betriebe geeignet das Wohlbefinden der Kühe abzubilden. Zwar ist es möglich auch auf Gruppen und auf Individualebene grundsätzliche Aussagen über das Tierwohl treffen zu können, dies liegt aber prinzipiell nicht in der Intention des AWAP. Je kleiner der Stichprobenumfang ist, umso schwieriger fällt natürlicherweise eine allgemeine Aussage über den gesamten Betrieb bzw. die dazugehörige Gruppe. Nichtsdestotrotz erscheinen die tierbezogenen Parameter gut geeignet, um eine tierindividuelle Aussage hinsichtlich des Tierwohls formulieren zu können. So lassen sich Schlüsse aus der Körperkondition, den klinischen Parametern, dem Abliegevorgängen und dem Sozialverhalten sehr wohl für Einzeltiere ziehen.

Die Umsetzung des Protokolls ist hilfreich, um ein Haltungssystem hinsichtlich der Tiergerechtheit zu bewerten und bietet eine Erweiterung hinsichtlich den „klassischen“ Beurteilungskriterien wie bspw. Tier-Fress-Platz-Verhältnis und ähnlichen Parametern, in dem der Fokus mehr auf das Tier gesetzt wird. Diese außerordentliche Sichtweise ermöglicht eine Beurteilung des gesamten Stalles, als auch eine tierindividuelle Einschätzung.

Die Blutproben der Kühe waren gruppiert in „auffällige“ und „unauffällige“. In der Differentialanalyse wurde von den sich wiederholbar nachweisbaren 1057 Metaboliten 93 identifiziert, in denen sich die beiden Gruppen voneinander unterscheiden. Ein Großteil dieser Metabolite war in der „auffälligen“ Gruppe reduziert und lediglich 21 der 93 Metabolite waren erhöht. Interessanterweise war das Metabolit mit der höchsten Erhöhung Häm. Das korreliert mit Differenzen in der Färbung der abzentrifugierten Proben die als zusätzliche Information erfasst wurde. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass es sich hierbei offensichtlich nicht um einen methodischen Fehler handelt (Fehler bei der Blutentnahme), sondern dass dieser Unterschied mit einer Temperamentseinschätzung korrelierte.

In den Kälberproben wurden drei verschiedene Differentialanalysen jeweils für die Faktoren „Total Score“, „Relation A“ und „Relation B“ durchgeführt. In allen dreien war Triethanolamin das meist bzw. unter den am meisten erhöhten Metaboliten in den Gruppen „ruhig, „aktiv2“ und „2aktiv“.

Außerdem zeigte sich in den Gruppen „ruhig“ und „aktiv2“, dass die gleichen Hormone hochreguliert waren. In beiden Fällen handelte es sich dabei um Derivate von Cholesta-8-en-3beta-ol.

Von denen in TP 3.2 identifizierten Biosignaturen Cystathione, Pregnenolone, Allopregnanolone und N-acetyl-cysteine wurden keine Metabolite in den Blutproben der Kühe oder der Kälber identifiziert.

Auch die in TP 4.2 identifizierten Metabolite wurden nicht in den Blutproben der Kühe und der Kälber wiedergefunden. Wobei das nicht bedeutet dass diese Metabolite nicht vorhanden waren. Die angewendete Methode war eine non-targeted Metabolit Profilinganalyse, so dass keine gezielte Analyse dieser Metabolite stattfand. Die Aufklärung und Bedeutung der Stoffwechselwege, für die die identifizierten Meatbolite stehen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Nachdem bisherigen Erkenntnisstand ist es derzeit noch nicht möglich das AWAP mit entsprechenden Biosignaturen derart zu ergänzen, um das Protokoll zu verkürzen noch eine entsprechende Aussage über das Haltungssystem respektive die Anpassung der Kühe an das Haltungssystem abzubilden. Zukünftig sollte daher weiterhin ein Ansatz mittels Biosignaturen entwickelt werden, der eine integrale Bewertung der Haltungsverfahren, als auch eine belastbare Einschätzung des Wohlbefindens des Einzeltieres ermöglicht.

Anhang zu 2.2.5

Identifizierte Metabolite Kühe	Methode
12-Tridecene-4,6,8,10-tetraynal	LC-QTOF/MS
2-(3-carboxy-3-(trimethylammonio)propyl)-L-histidine	LC-QTOF/MS
2-Hydroxyethanesulfonate	LC-QTOF/MS
3,4-Dimethyl-5-pentyl-2-furanundecanoic acid	LC-QTOF/MS
3-O-(6'-O-eicosanoyl-beta-D-glucopyranosyl)-campest-5-en-3beta-ol	LC-QTOF/MS
4alpha-carboxy-4beta-methyl-5alpha-cholesta-8-en-3beta-ol	LC-QTOF/MS
Erythrose	GC-MS
Xylulose	GC-MS
Sorbitol-6-phosphate	GC-MS
Ala-Phe-Thr-Ser	LC-QTOF/MS
Alatanin 2	LC-QTOF/MS
Allantoin	LC-QTOF/MS
Arg-Leu-Met-Pro	LC-QTOF/MS
Arg-Leu-Phe-Phe	LC-QTOF/MS
Arg-Lys-Asn-Pro	LC-QTOF/MS
Arg-Met-Arg-His	LC-QTOF/MS
Arg-Met-Phe-Asp	LC-QTOF/MS
Asn-Asn-Asn-Asp	LC-QTOF/MS
Aspartyl-Tyrosine	LC-QTOF/MS
Cabbage identification factor 2	LC-QTOF/MS
Cerebronic acid	LC-QTOF/MS
Met Val His Leu Thr	LC-QTOF/MS
FA hydroxy(24:0)	LC-QTOF/MS
Heme	LC-QTOF/MS
L-Cyclo(alanylglycyl)	LC-QTOF/MS

L-Glutamic acid	LC-QTOF/MS
L-Homoserine	LC-QTOF/MS
LPA(0:0/18:2(9Z,12Z))	LC-QTOF/MS
LysoPC(18:2(9Z,12Z))	LC-QTOF/MS
LysoPC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	LC-QTOF/MS
Lysyl-Leucine	LC-QTOF/MS
4-Hydroxyhippuric acid	LC-QTOF/MS
N-Acetyl-9-O-acetylneuraminic acid	LC-QTOF/MS
NeuAcalpha2-3Galbeta-Cer(d18:1/18:0)	LC-QTOF/MS
Octadecanamide	LC-QTOF/MS
Oleamide	LC-QTOF/MS
PE(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/18:0)	LC-QTOF/MS
PE(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/20:2(11Z,14Z))	LC-QTOF/MS
PE(P-18:1(11Z)/20:3(8Z,11Z,14Z))	LC-QTOF/MS
PE(P-42:6)	LC-QTOF/MS
PI(18:2(9Z,12Z)/20:2(11Z,14Z))	LC-QTOF/MS
Pentyl glucosinolate	LC-QTOF/MS
Physalin K	LC-QTOF/MS
S-(2-Chloroacetyl)glutathione	LC-QTOF/MS
SM(d18:1/18:1(11Z))	LC-QTOF/MS
SM(d18:1/22:1(13Z))	LC-QTOF/MS
SM(d33:2)	LC-QTOF/MS
SM(d34:2)	LC-QTOF/MS
TG(18:1(9Z)/16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))[iso6]	LC-QTOF/MS
Taurine	LC-QTOF/MS
Thiolutin	LC-QTOF/MS
[Fv] Ovalitenin A	LC-QTOF/MS
all-trans-undecaprenyl diphosphate	LC-QTOF/MS
all-trans-undecaprenyl group	LC-QTOF/MS

Identifizierte Metabolite Kälber	Methode
1-Isopropyl citrate	LC-QTOF/MS
1-thio-beta-D-glucose	LC-QTOF/MS
2,2-Dihydroperoxypropane	LC-QTOF/MS
2,8-Dihydroxyquinoline-beta-D-glucuronide	LC-QTOF/MS
2-Deoxy-L-ribono-1,4-lactone	LC-QTOF/MS
2-Pyrrolidinone	LC-QTOF/MS
24-Hydroxycalcitriol	LC-QTOF/MS
27-Nor-5b-cholestane-3a,7a,12a,24,25-pentol	LC-QTOF/MS
3-O-Caffeoyl-4-O-methylquinic acid	LC-QTOF/MS
3-Sulfinoalanine	LC-QTOF/MS
4-Imidazolone-5-propionic acid	LC-QTOF/MS
4alpha-formyl-4beta-methyl-5alpha-cholesta-8-en-3beta-ol	LC-QTOF/MS
5-Hydroxy-4-methoxy-3-methyl-2,6-canthinedione	LC-QTOF/MS
7-Hydroxy-8-O-methylaloin B	LC-QTOF/MS
9-Octadecenoic acid 1-[[(1-oxohexadecyl)oxy]methyl]-2-(phosphonoxy)ethyl ester	LC-QTOF/MS
Threonine	GC-MS
n-6,9,12-(Z,Z,Z)-Octadecatrienoic acid	GC-MS
Ala-Asn-Asp-His	LC-QTOF/MS
Ala-Leu-Trp-Trp	LC-QTOF/MS
Ala-Met-Pro-His	LC-QTOF/MS
Ala-Met-Val-Pro	LC-QTOF/MS
Ala-Trp-Cys-Ser	LC-QTOF/MS
Arg-Asp-Cys-Tyr	LC-QTOF/MS
Arg-Asp-Gly-Tyr	LC-QTOF/MS
Arg-Leu-Phe-Gln	LC-QTOF/MS

Arg-Thr-Cys-His	LC-QTOF/MS
Asn-Asp-Pro-Ser	LC-QTOF/MS
Asn-Lys-Met-Thr	LC-QTOF/MS
Asp-Met-Ser-Ser	LC-QTOF/MS
Asp-Phe-Trp-Gly	LC-QTOF/MS
Axillarenic acid	LC-QTOF/MS
Benzyl alcohol	LC-QTOF/MS
Benzyl sulfate	LC-QTOF/MS
Cyclobrassinone	LC-QTOF/MS
Dehydroepiandrosterone sulfate	LC-QTOF/MS
Gln-Lys-Met-Thr	LC-QTOF/MS
Glu-Met-Phe-Pro	LC-QTOF/MS
Guanidoacetic acid	LC-QTOF/MS
Homovanillin	LC-QTOF/MS
Hydroxyphenylacetylglycine	LC-QTOF/MS
Ile-Gly-Val	LC-QTOF/MS
Indoxyl sulfate	LC-QTOF/MS
Isoputreanine	LC-QTOF/MS
Isovalerylsarcosine	LC-QTOF/MS
Met-Ala-Arg	LC-QTOF/MS
Methylhippuric acid	LC-QTOF/MS
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)valine	LC-QTOF/MS
N-Acetyl-9-O-acetylneuraminic acid	LC-QTOF/MS
N-Acetyl-a-neuraminic acid	LC-QTOF/MS
N-Acetyl-leukotriene E4	LC-QTOF/MS
Norfuraneol	LC-QTOF/MS
PE(P-18:1(9Z)/16:1(9Z))	LC-QTOF/MS
PS(O-18:0)	LC-QTOF/MS
Phenethylamine glucuronide	LC-QTOF/MS

Physagulin A	LC-QTOF/MS
Pinotin A aglycone	LC-QTOF/MS
Pro-Val-Pro-Tyr	LC-QTOF/MS
Propylene glycol mono- and diesters of fats and fatty acids	LC-QTOF/MS
Quercetin 3-arabinoside 7-glucoside	LC-QTOF/MS
Riboflavin cyclic-4',5'-phosphate	LC-QTOF/MS
Serinyl-Valine	LC-QTOF/MS
Sphingosine 1-phosphate (d16:1-P)	LC-QTOF/MS
TG(18:1(9Z)/16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))[iso6]	LC-QTOF/MS
Tauropine	LC-QTOF/MS
Triethanolamine	LC-QTOF/MS
Valyl-Proline	LC-QTOF/MS
Vanillin 4-sulfate	LC-QTOF/MS
[FA (26:0/2:0)] Hexacosanedioic acid	LC-QTOF/MS
[FA methyl,oxo,hydroxy(3:0/3:0/3:0)] methyl 5S,6R,7R-triacetoxy-9-oxo-10-chloro-12S-hydroxy-10Z,14Z,17Z-prostatrienoate-cyclo[8R,12S]	LC-QTOF/MS
[GL (16:0/16:0)] 1-hexadecanoyl-2-(9Z-hexadecenoyl)-3-(6'-sulfo-alpha-D-quinovosyl)-sn-glycerol	LC-QTOF/MS
beta-D-Ribofuranose	LC-QTOF/MS

3. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es existiert eine große Anzahl an Indikatoren und eine Reihe von Indikatorensystemen für ‚Tierwohl' und ‚Tiergerechtheit' wie der ‚Tiergerechtheitsindex' (TGI), der ‚Nationale Bewertungsrahmen Tierhaltungsverfahren', der ‚Welfare Quality Index', die ‚Critical Control Points' (CCP) oder die ‚Tierschutz-Labels', die für verschiedene Anwendergruppen und Zwecke (z.B. Politikberatung, Betriebsplanung, Eigenmonitoring, Produktkennzeichnung von Handels- und Vermarktungsunternehmen) konzipiert wurden. Die Einbeziehung von ressourcen- und management-basierten, aber auch tierbezogenen (‚outcome-based') Indikatoren erlaubt zunehmend eine objektivere retrospektive Schätzung des Tierwohls des Gesamtsystems (Wertschöpfungskette).

Es ist aber mittlerweile weitgehender Konsens, dass das Wohlergehen von Tieren neben einer Reihe physischer Gewährleistungen auch eine psychisch-emotionale Komponente beinhaltet, unabhängig davon, dass Fragen nach dem Bewusstsein bei Tieren und ihrem subjektiven Erleben wissenschaftlich durchaus kontrovers diskutiert werden. Ausgehend von den Erkenntnissen der Angewandten Ethologie lässt sich Wohlbefinden als eine Zustandsgröße beschreiben, die sich über die (messbaren) Fähigkeiten eines Individuums sich anzupassen und mit seiner Umwelt zurechtzukommen (englisch: coping) definieren lässt, einschließlich einer emotional geprägten Bewertung des Ergebnisses dieses Bewältigungsverhaltens. Diese sich zunehmend verbreitende Auffassung spiegelt sich in dem exponentiellen Anstieg der Anzahl an Publikationen zu den genetischen und physiologischen Grundlagen des Verhaltens bei verschiedenen Nutztierarten in den letzten Jahren seit Beginn der Durchführung dieses Vorhabens wider. Es wird zunehmend versucht, die vergleichsweise anthropozentrisch geprägten Vorstellungen durch die Einbeziehung und Entwicklung konkreter naturwissenschaftlicher und psychophysiologischer Parameter zu untersetzen bzw. zu ergänzen, die eine Interpretation bezüglich der Anpassungs- und Bewältigungskompetenz von Tieren – und damit ihrem Wohlbefinden - erlauben. Eine umfassende Literaturanalyse wird in Friedrich et al. (Genetics of cattle temperament and its impact on livestock production and breeding- a review. Arch Anim. Breed. 58 (2015), 13-21) vorgenommen (s.a. Anlage, Kapitel 5.2).

Insgesamt ist aber einzuschätzen, dass die Erfassung und Bewertung subjektiver Empfindungen des Tieres als wichtiges Element des Wohlbefindens in den bisherigen Ansätzen zum ‚Tierwohl' weitgehend unberücksichtigt bleibt. In Analogie zum Menschen ist offensichtlich, dass nur ein möglichst holistischer, multi- und interdisziplinärer Ansatz der Begrifflichkeit Wohlbefinden gerecht werden kann. Einen solchen umfassenden Ansatz gibt es bisher nicht.

Mit seinem systembiologischen Ansatz, dessen Grundidee die komplexe horizontale und vertikale Verknüpfung verschiedenster Parameterebenen des Organismus ist (vgl. Kapitel 1.3 des Berichtes), kann hier mittels des Kompetenznetzes PHÄNOMICS ein entscheidender Wissenszuwachs gelingen, der über die Deutung einzelner Indikatoren weit hinausgeht.

Bislang steht kein allgemein anerkanntes Indikatoren-Set für die Messung und Bewertung des ‚Tierwohls' oder der ‚Tiergerechtheit' am Tier zur Verfügung.

4. Veröffentlichungen

4.1 Erfolgte bzw. im Druck befindliche Veröffentlichungen

Brand, B.; Hadlich, F.; Brandt, B.; Schauer, N.; Graunke, K.L.; Langbein, J.; Repsilber, D.; Ponsuksili, S.; Schwerin, M. (2015): Temperament type specific metabolite profiles of the prefrontal cortex and serum in cattle. PLOS ONE 2015, DOI: 10: e0125044

Düpjan, S.; Schön, P.-Ch.; Puppe, B. (2011): Wie wird das Wohlbefinden gemessen? Das Wohlergehen und tiergerechtere Haltungsverfahren in der Schweinehaltung fördern. Fleischwirtschaft 91: 14-16

Friedrich, J.; Brand, B.; Schwerin, M. (2015): Genetics of cattle temperament and its impact on livestock production and breeding- a review. Arch Anim. Breed. 58, 13-21.

Friedrich, J.; Brand, B.; Knaust, J.; Kühn, Ch.; Schwerin, M. (2015): Detection of genetic variations affecting cattle behaviour and their impact on milk production – a genome-wide association study. Animal Genetics 2015 DOI: 10.1111/age.12371

Graunke, K.L.; Langbein, J.; Repsilber, D.; Schön, P.-Ch. (2013): Objectively measuring behaviour traits in an automated restraint test for ungulates: towards making temperament measurable. J Agr Sci 151: 141-149.

Graunke, K.L.; Nürnberg, G.; Repsilber, D.; Puppe, B.; Langbein, J. (2013): Describing temperament in an ungulate: A multidimensional approach. Plos One 8: e74579

Graunke, K.L.; Telezhenko, E.; Hessle, A.; Bergsten, C.; Loberg, J. M. (2011): Does rubber flooring improve welfare and production in growing bulls in fully slatted floor pens? Anim Welfare 20: 173-183

Krause, A.; Zebunke, M.; Tuchscherer, A.; Bellmann, O.; Mohr, E.; Langbein, J.; Puppe, B. (2014): Verhalten und autonome Reaktion von Schweinen als Indikator für Wohlbefinden in unterschiedlichen Haltungssituationen. In: 15th Day of the Doctoral Student (Kühn, C., Viereck, G., Hrsg.) Schriftenreihe des FBN 23: 17-20

Langbein, J.; Meyer, S.; Puppe, B. (2011): Kognitive Fähigkeiten von Nutztieren und kognitive Umweltanreicherung - Implikationen für Haltung und Wohlbefinden.. In: Tierschutz: Anspruch - Verantwortung - Realität, (Johannes Baumgartner, Daniela Lexer; Hrsg.) Sektion Tierhaltung und Tierschutz der ÖTT, Wien: 15-23

Mahnhardt, S.; Brietzke, J.; Tuchscherer, A.; Schön, P.-Ch.; Gimsa, U.; Manteuffel, G. (2013): Erfassung der Herzaktivität und des Verhaltens beim Hausschwein in einem emotionalen Antizipationsparadigma. In: Aktuelle Arbeiten zur artgemäßen Tierhaltung (KTBL Schrift 503) (KTBL; Hrsg.) KTBL, Darmstadt: 106-115

Mahnhardt, S.; Brietzke J.; Tuchscherer, A.; Schön, P.C.; Gimsa, U.; Manteuffel, G. (2014): Erfassung der affektiven Herzaktivität und des Verhaltens beim Hausschwein (Sus scrofa domestica) in einem emotionalen Antizipationsparadigma. In: 15th Day of the Doctoral Student (Kühn, C., Viereck, G., Hrsg.) Schriftenreihe des FBN 23: 21-24

Melzer, N.; Wittenburg, D.; Repsilber, D. (2013): Investigating a complex genotype phenotype map for development of methods to predict genetic values based on genome wide marker data a simulation study for the livestock perspective. Arch Tierzucht 56 (doi: 10.7482/0003 9438 56 038)

Puppe, B.; Zebunke, M.; Düpjan, S.; Langbein, J. (2011): Kognition und Emotion - Relevanz für Haltung und Wohlbefinden. Verlag der DVG Service GmbH, Giessen: 24-37

Puppe, B.; Zebunke, M.; Düpjan, S.; Langbein, J. (2012): Kognitiv-emotionale Umweltbewältigung beim Hausschwein - Herausforderung für Tierhaltung und Tierschutz. Züchtungskunde 84: 307-319

Stracke, J.; Düpjan, S.; Tuchscherer, A.; Puppe, B. (2014): Wiederholtes Testen in einem cognitive bias Paradigma beim Hausschwein. In: Aktuelle Arbeiten zur artgemäßen Tierhaltung 2014, KTBL, Darmstadt, KTBL-Schrift 505: 24-33

Strunz, S.; Kacprowski, T.; Melzer, N.; Friedrich, J.; de la Fuente, A. (2014): A Core Transcriptional Regulatory Network in Cows. In: Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (American Society of Animal Science; Hrsg.): 653

Stukenborg, A., Traulsen, I., Puppe, B., Presuhn, U., Krieter, J. (2011): Agonistic behaviour after mixing in pigs under commercial farm conditions. Applied Animal Behaviour Science 129:28-35

Stukenborg, A., Traulsen, I., Stamer, E., Puppe B., Krieter, J. (2012): The use of a lesion score as an indicator for agonistic behaviour in pigs. Archiv für Tierzucht 55:163-170

Zebunke, M., Langbein, J., Manteuffel, G., Puppe, B. (2011): Autonomic reactions indicating positive affect during acoustic reward learning in pigs. Animal Behaviour 81:481–489

Zebunke, M.; Nürnberg, G.; Repsilber, D.; Puppe, B. (2013): Der Backtest beim Schwein - Individuelle Variation im Verhalten oder Verhaltensstrategie? In: Aktuelle Arbeiten zur artgemäßen Tierhaltung 2013 (KTBL Schrift 503) (KTBL; Hrsg.) KTBL, Darmstadt: 188-197

Zebunke, M.; Puppe, B.; Langbein, J. (2013): Effects of cognitive enrichment on behavioural and physiological reactions of pigs. Physiol Behav 118: 70-79

4.2 Zur Publikation eingereichte Veröffentlichungen

Friedrich, J.; Brand, B.; Hadlich, F.; Ponsuksili, S.; Graunke, K.L.; Langbein, J.; Schwerin, M. (2015): Whole genome expression profiling of the adrenal cortex revealed transcripts with impact on behaviour traits in cattle.

Bodo Brand, Markus O. Scheinhardt, Juliane Friedrich, Daisy Zimmer, Norbert Reinsch, Siriluck Ponsuksili, Andreas Ziegler, Manfred Schwerin, Adrenal cortex expression quantitative trait loci in a Holstein Fresian X Charolaise cross. BMC Genomics

Melzer, N.; Friedrich, J.; Nürnberg, G.; Repsilber, D.; Schwerin, M.; Brand, B. : Investigating associations between gene expression profiles and milk performance of a F2 crossbreed between Charolais and German Holstein. BMC Genomics

4.3 Veröffentlichungen in Vorbereitung

Evaluating existing behavior related biomarkers on known and new behavioral phenotypes for beef and dairy cattle

Juliane Friedrich, Borbala Foris, Silke Trißl, Gerd Nürnberg, Bodo Brand, Katharina Graunke, Jan Langbein