

Aus dem Institut für Anatomie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. phil. nat. Charlotte von Gall

Wie beeinflusst das rote Haus die Synchronisation zirkadianer
Rhythmen bei BMAL1-Knockout-Mäusen?

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Menekse Öztürk
2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj-Klöcker

Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. phil. nat. Charlotte von Gall

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Sager

Für meinen Opa
Mehmet Sami Ayik

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Öztürk, M., Ingenwerth, M., Sager, M., von Gall, C., Ali, A.A.H., (2021), Does a Red House Affect Rhythms in Mice with a Corrupted Circadian System? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2288 [1]

Zusammenfassung

Zahlreiche physiologische Vorgänge in Säugetieren unterliegen zirkadianen Rhythmen, die von einem zirkadianen System koordiniert und unterhalten werden. Der Schlaf-Wach-Rhythmus stellt bei vielen terrestrischen Lebewesen eine bekannte Manifestation zirkadianer Rhythmen dar. Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) ist ein paariges Kerngebiet im Hypothalamus und kontrolliert als zentraler zirkadianer Rhythmusgenerator untergeordnete zirkadiane Oszillatoren in Gehirn und Peripherie.

Informationen über die Lichtverhältnisse der Umwelt gelangen über eine Faserbahn, den Tractus retinohypothalamicus (RHT), von der Retina zum SCN mit dem Ziel, die rhythmischen Körperfunktionen und Verhaltensmuster mit dem externen Licht-Dunkelheit-Zyklus abzustimmen. Über diese Bahn wird auch die Aktivität von nachtaktiven Nagetieren, unabhängig vom zirkadianen System, durch Licht gehemmt. Auf zellulärer Ebene setzt sich das molekulare Uhrwerk aus miteinander verzahnten transkriptional-translationalen Rückkopplungsschleifen aus so genannten Uhrengenen zusammen, die eine rhythmische Genexpression antreiben. Ein zentrales Uhrengen ist Bmal1. Mäuse mit einer gezielten Deletion von Bmal1 (Bmal1^{-/-}) weisen ein defektes molekulares Uhrwerk und entsprechend gestörte zirkadiane Rhythmen auf. Licht hemmt auch die Aktivität der Bmal1^{-/-} Mäuse, bei ihnen ist zugleich der Lichteingang in das zirkadiane System geringfügig gestört. Dies demonstriert, dass das molekulare Uhrwerk auch eine wichtige Rolle bei der regulären Retinafunktion und der lichtinduzierten Signaltransduktion im SCN spielt.

Das rote Haus (RH) gehört zu verbreiteten Maßnahmen, die das Wohlbefinden von Tieren in wissenschaftlichen Haltungen optimieren sollen. Es besteht aus rotem transparentem Kunststoff und bietet Labormäusen einen dunklen Rückzugsort und Schlafplatz, in dem langwelliges Licht mit schwacher Bestrahlungsstärke herrscht. Da Mäuse nachaktiv sind, erwachen sie, wenn das zirkadiane System intakt ist, am Ende der Lichtphase bzw. zu Beginn der Dunkelphase. Wenn die Lichtperzeption intakt ist, werden sie, falls sie in der Lichtphase wach werden, das Licht wahrnehmen können, ohne den Schlafplatz verlassen zu müssen. Somit ist das RH für Mäuse mit einem intakten molekularen Uhrwerk und einer intakten Lichtperzeption unproblematisch für die Koordination zirkadianer Rhythmen mit dem externen Licht-Dunkelheit-Zyklus. Wie sich das RH auf das rhythmische Verhalten von Mäusen mit einem defekten molekularen Uhrwerk und einer gestörten Lichtperzeption auswirkt, ist bisher nicht bekannt und Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Es wurde untersucht, wie das RH die spontane rhythmische lokomotorische Aktivität von Bmal1^{-/-} Mäusen beeinflusst. Darüber hinaus haben wir mittels Immunhistochemie den Tagesverlauf von Markern für das molekulare Uhrwerk bzw. für die neuronale Aktivität, PER1 und p-ERK, im SCN untersucht. Des Weiteren wurde der tageszeitliche Verlauf der Corticosteron-Spiegel im Serum der Mäuse untersucht, da die Synthese dieser Hormone nicht nur durch Stress induziert wird, sondern auch ein bedeutendes rhythmisches Signal im zirkadianen System darstellt. Unsere Daten weisen insgesamt darauf hin, dass der Einsatz des RH bei Bmal1^{-/-} Mäusen das rhythmische lokomotorische Verhalten und weiterhin die rhythmische neuronale Aktivität des SCN stört. Auf die Corticosteron-Spiegel hatte das RH dagegen keinen Einfluss. Wir empfehlen daher, die Verwendung des RH bei Mäusen mit defektem zirkadianem System und/ oder gestörter Lichtperzeption kritisch zu bewerten, insbesondere bei Verhaltensstudien.

Summary

Numerous body functions in mammals emerge from circadian rhythms, coordinated and maintained by a circadian system. A well-known manifestation of circadian rhythms in terrestrial creatures is the sleep-wake cycle. The suprachiasmatic nucleus (SCN) is a paired core area in the hypothalamus working as a central circadian pace-maker and controlling subordinate oscillators in brain and periphery.

Information about the environmental time is transferred via the retinohypothalamic tract (RHT) to the SCN, in order to align physiological functions and rhythmic behavior with external light-dark-cycles. Moreover, this pathway suppresses activity in nocturnal rodents through light, regardless of the circadian system.

Focusing on a cellular approach, the molecular clockwork consists of linked transcriptional/translational feedback loops of so-called clock genes, intending to push rhythmic gene expression. One central clock gene is *Bmal1*. Mice with a selected deletion of *Bmal1* (*Bmal1*^{-/-}) present a disrupted molecular clockwork and accordingly, show corrupted circadian rhythms. Light inhibits activity in *Bmal1*^{-/-} mice likewise, light input into the circadian system is slightly disrupted, displaying the importance of the molecular clockwork in the regular function of the retina and the light-induced signal transduction in the SCN.

The red house (RH) is one of many measures to improve well-being of animals in scientific research. It is built of red transparent plastic and provides shelter and sleeping facility to laboratory mice with long-wavelength light of low irradiance.

Due to mice being nocturnal, they will awake in the end of the light phase or rather in the beginning of the dark phase, if an intact circadian system is given. With an unimpaired light perception, they will, if waking up during the light phase, be able to detect light without having to exit the shelter. Consequently, the RH is unproblematic for mice with an undamaged molecular clockwork and unscathed light perception regarding adjustment of circadian rhythms to the external light/dark cycle.

The way the RH is influencing rhythmic behavior in mice with a malfunctioning molecular clockwork and light perception, is not known so far and topic of the present study. We addressed, how the RH modulates spontaneous rhythmic locomotor activity in *Bmal1*^{-/-} mice. Furthermore, we analyzed daily developments of PER1 and p-ERK in the SCN as markers of neuronal activity and of the molecular clockwork via Immunohistochemistry. Furthermore, we appraised day/night plasma corticosterone levels due to the known rhythmic distribution and the synthesis being triggered by stress.

Overall, our data implies, that the usage of the RH in *Bmal1*^{-/-} mice obliterates rhythmic locomotor behavior. Continuously, rhythmic SCN neuronal activity is diminished. Nevertheless, no difference in the rhythmic release of corticosterones throughout all subgroups was detectable. Thus, we recommend questioning the application of the RH in mice with a disturbed circadian system or light-input pathway, particularly in behavioral studies.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
CGL	Corpus geniculatum laterale
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRY	<i>Cryptochrome</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMH	Nucleus dorsomedialis hypothalami
d. h.	das heißt
dmSCN	dorsomedialer Teil des Nucleus suprachiasmaticus
dt.	deutsch
ebd.	ebenda
etc.	et cetera (dt. und weitere)
ELK1	<i>ETS Like-1 protein Elk-1</i>
ERK1/2	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
GHT	Tractus geniculohypothalamicus
HHN	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
I.E.	Internationale Einheit
ipRGCs	Intrinsisch photosensitive retinale Ganglienzellen
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
lat.	lateinisch
LD	12-Stunden-Licht/ 12-Stunden-Dunkelheit
LL	konstante Lichtbestrahlung
Nucleus	Nucleus (dt. Kern)
NMDA	N-Methy-D-Aspartat

Per	<i>Period</i>
RHT	Tractus retinohypothalamicus
RH	Rotes Haus
s. a.	siehe auch
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SEV	Sammlung der Europaratsverträge
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutzversuchsverordnung
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
vISCN	ventrolateraler Teil des Nucleus suprachiasmaticus
VMH	Nucleus ventromedialis hypothalami
z. Dt.	zu Deutsch
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZT	<i>Zeitgeber Time</i>
3R	3R-Prinzip nach Russel und Burch: „ <i>replace</i> “, „ <i>reduce</i> “ and „ <i>refine</i> “

SI-Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
g	Gramm
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
sek	Sekunde

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zirkadiane Rhythmen	1
1.2	Das zirkadiane System	3
1.3	Lichtperzeption	8
1.4	Das molekulare Uhrwerk	10
1.4.1	Entrainment und Masking	12
1.5	Environmental Enrichment	13
1.5.1	Das 3R-Prinzip	16
1.5.2	Gesetzeslage	16
1.6	Tierversuchsgenehmigung	18
1.7	Ziele dieser Arbeit	19
2	Does a Red House Affect Rhythms in Mice with a Corrupted Circadian System? Öztürk, M., Ingenwerth, M., Sager, M., von Gall, C., Ali, A.A.H., International Journal of Molecular Sciences, 22(5), 2288, (2021)	21
3	Diskussion	22
3.1	Das rote Haus als Enrichment-Maßnahme	22
3.2	Einfluss des RH auf die spontane lokomotorische Aktivität	23
3.3	Auswirkungen auf das molekulare Uhrwerk	25
3.4	Stressbelastung der Versuchstiere	27
3.5	Schlussfolgerung	27
4	Literaturverzeichnis	29
5	Quellenverzeichnis	40

1 Einleitung

1.1 Zirkadiane Rhythmen

In der Domäne der Chronobiologie beschreiben zirkadiane Rhythmen endogene rhythmische Aktivitäten mit einer Periodenlänge von etwa 24 Stunden. Diese Rhythmen modulieren bei zahlreichen Spezies, inklusive des Menschen, physiologische Funktionen, Verhalten und Stoffwechselprozesse [2]. Hierbei kann das Wort „zirkadian“ als Adjektiv aus dem Lateinischen (*circa* „ungefähr/ annähernd“, *dies* „Tag“) mit „etwa einen Tag lang“ interpretiert werden.

Zirkadiane Rhythmen bestehen in Synchronisation zu den natürlichen Tag-Nacht-Verhältnissen auf unserer Erde, denen alle Lebewesen ausgesetzt sind. Tag um Tag ereignet sich die Rotation der Erde um ihre eigene Achse mit der Konsequenz, dass sich eine bestimmte Position auf der Erdoberfläche periodisch zur Sonne hin- und von ihr wegbewegt. Auf diese Weise entstehen alternierende Bedingungen in der Umwelt, denen zahlreiche Organismen unterliegen.

Indizien dafür, dass Rhythmen „programmiert“ und keine träge Antwort an die Umgebung sind, sind bereits seit Jahrhunderten beschrieben [3]. 1792 beobachtete Jean Jacques d'Ortous De Mairan, ein französischer Geophysiker und Astronom, das täglich wiederkehrende Zusammenschlagen und Entfalten von Laubblättern der Mimose [4]. Dieser Rhythmus hielt auch an, als er die Pflanze permanenter Dunkelheit in einem Wandschrank aussetzte. Daraus folgte De Mairan, dass Rhythmen einem inneren System entstammen müssten. Er skizzierte Experimente zur weiteren Entschlüsselung seiner Feststellungen und lud Wissenschaftler weiterer Disziplinen dazu ein, den Inhalten nachzugehen [3, 4]. Die Entwicklung zirkadianer Rhythmen setzte evolutionsbiologisch früh ein und findet sich in einer Vielzahl verschiedenster Lebewesen, von Prokaryoten bis zu höher entwickelten Säugetieren [5, 6]. Der evolutionäre Vorteil besteht in der Antizipation der Licht-Dunkel-Phasen, welche eine schnellere Resonanz auf Fluktuationen in der Umwelt ermöglicht [7].

Ein sehr einprägsames Beispiel ist das Verhalten von Sonnenblumen im Tagesverlauf: Junge Sonnenblumen sind am Morgen ostwärts ausgerichtet, um

Sonnenstrahlen einzufangen. Sie folgen dem Pfad der Sonne in den Westen bis in die Abendstunden um dann, die Morgendämmerung antizipierend, sich wieder Richtung Osten zu formieren [8].

Das zirkadiane System der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) wurde in der Chronobiologie als eines der Ersten erforscht und fungiert als Modellkonstruktion, welche viele Überschneidungen mit zirkadianen Systemen von Säugetieren aufweist [9, 10]. Als erste Prokaryoten, in denen eine zirkadiane Organisation nachgewiesen wurde, gelten Cyanobakterien [11]. Die Bakterienstämme, deren Periodenlänge sich der Zyklusdauer von Licht und Dunkelheit näherte, zeigten einen Überlebensvorteil aufgrund einer verbesserten „reproduktiven Fitness“ [12]. Auch Pilzgattungen wie *Neurospora crassa* organisieren sich gemäß ihrer inneren Uhr [13].

In Säugetieren ist die innere Uhr als zirkadianes System etabliert [2]. Experimentelle Sequenzierungen des Genoms von Mäusen haben ergeben, dass insgesamt 43 % aller für Proteine codierenden Gene einem 24-Stunden-Rhythmus entsprechend transkribiert werden [14]. Diese Untersuchungen wurden auch aufgrund des Anspruches unternommen, die Bedeutsamkeit der zirkadianen Uhr im Mäuseorganismus zu illustrieren [14]. Zhang et al. beobachteten Stoßzeiten in der Genexpression jeweils vor der Dämmerung und beschrieben diese als „transkriptionale *rush hours*“ [14].

Diese Genexpression wiederum beeinflusst physiologische Prozesse: Die prominenteste Manifestation zirkadianer Rhythmen stellt bei vielen terrestrischen Organismen der Schlaf-Wach-Rhythmus dar. Daneben ordnen sich beispielhaft auch die Körpertemperatur oder die Herzfrequenz zirkadianen Rhythmen unter [15, 16]. Die ebenfalls tageszeitabhängigen Veränderungen des Blutdruckes und der Herzauswurfleistung werden in der Humanmedizin auch vor dem Hintergrund der morgendlichen Häufung von Schlaganfällen und akuten Koronarsyndromen beleuchtet [17-19]. So beschäftigen sich einige Autor*innen mit möglichen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen durch Entschlüsselung der zeitlichen Verteilung, beispielsweise zerebraler Ischämien oder Blutungen [20]. Unterdessen werden mögliche Präventionsstrategien unter dem Stichwort „Chronoprophylaxe“ thematisiert [20]. Fehlausrichtungen im zirkadianen System werden in der Ätiopathogenese metabolischer Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Adipositas diskutiert [21, 22]. Des Weiteren gelten Sie als

Risikofaktor für psychiatrische Erkrankungen, beispielsweise bipolar-affektive Störungen oder Schizophrenie [23]. Ein Zusammenhang zu onkologischen Leiden wird in der Literatur ebenfalls behandelt [24-26].

1.2 Das zirkadiane System

Die Kontrolle zirkadianer Rhythmen obliegt in Säugetieren einem organisierten Netzwerk, dem zirkadianen System. Dieses System umfasst mehrere Komponenten: den Weg des Lichteinganges, den zirkadianen Rhythmusgenerator und untergeordnete Oszillatoren [27].

Der zirkadiane Rhythmusgenerator, die „innere Uhr“, befindet sich in einem bestimmten bilateralen Kerngebiet des ventralen periventrikulären Hypothalamus [28]. Als Schrittmacher ist dieser definitionsgemäß in der Lage, als eine funktionale Entität selbstständig endogene Rhythmen zu generieren [29].

Aufgrund der unmittelbaren Nähe zu der Sehnervenkreuzung im Chiasma opticum, spricht man von den Nuclei suprachiasmatici (SCN) (vgl. Abb. 1.). Sie justieren zirkadiane Rhythmen durch Koordinierung untergeordneter Oszillatoren, welche letztlich Körperfunktionen, Stoffwechsel und Verhalten bestimmen [2]. Die beiden Kerne flankieren, wie in Abbildung 1 dargestellt, den dritten Hirnventrikel und lassen sich topographisch in einen inneren ventrolateralen (vlSCN) und äußeren dorsomedialen Teil (dmSCN) gliedern. Hierbei sind auch Bezeichnungen des vlSCN als „Kern“ und des dmSCN als „Schale“ geläufig [30]. Die beiden Areale kommunizieren durch wechselwirkende Signale und treiben so eine koordinierte elektrische Entladung an [31].

Außerdem besteht eine Verknüpfung zwischen dem linken und rechten SCN [32]. Unter bestimmten Bedingungen kann jeder Kern für sich als autonome Uhr fungieren [33, 34]. Darüber hinaus ist bekannt, dass es auch periphere, unterstellte Oszillatoren in zahlreichen Zellarten und nicht-neuronalen Geweben gibt [35], die Bezeichnung als „*slave oscillators*“ ist in der Literatur ebenfalls gängig [36]. In der Rangfolge aus vielen subordinativen Oszillatoren ganz oben bestimmt der SCN die Rhythmizität [37].

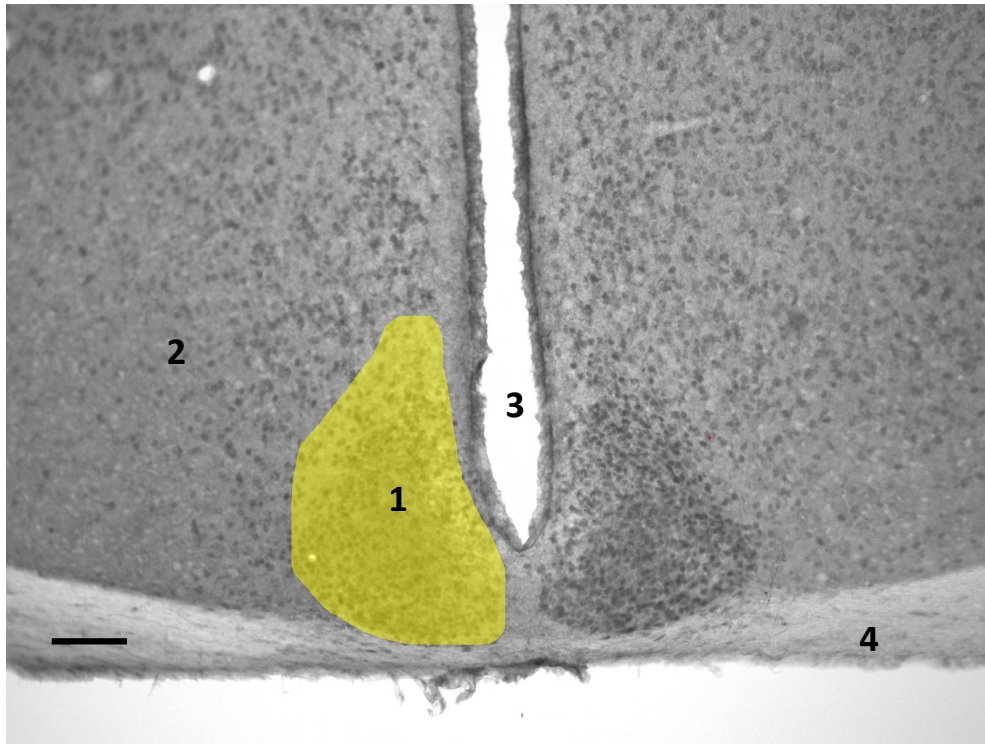


Abb. 1: Mikroskopische Darstellung des SCN einer Bmal1-/- Maus im Koronarschnitt (Schnittdicke 30 µm) nach immunhistochemischer DAB-Darstellung der PER1-Immunreaktion. Skala = 100 µm. Zehnfache Vergrößerung. Die paarigen Nuclei suprachiasmatici (1 = rechtshemisphärisch gelb markiert) grenzen kaudal an das Chiasma opticum (4 = Fasern der retinalen Ganglienzellen) und flankieren den 3. Hirnventrikel (3), sowie lateral den Hypothalamus (2).

Der SCN ist entscheidend in der Entstehung zirkadianer Prozesse: Bei Eliminierung des SCN in neonatalen Ratten konnte keine Ausbildung einer Verknüpfung zwischen Retina und SCN objektiviert werden [38]. In weiteren tierexperimentellen Studien veränderten sich bei chirurgischer Ablation des SCN beispielsweise die Winterruhe bei Eichhörnchen [39] oder bestimmte Eigenschaften von Neurorezeptoren im Rattenhirn [40]. Umgekehrt konnte nach Transplantation von SCN-Gewebe in zuvor abladierte, arrhythmische Tiere eine Wiederherstellung der Rhythmizität durch Übernahme des „Donor-Rhythmus“ beobachtet werden [41, 42]. Bei Patien*innen mit raumfordernden Hypophysentumoren, welche aufgrund ihrer angrenzenden Lokalisation den SCN und dessen Signalwege komprimieren, sind u. a. Schlafstörungen, Schwankungen der Körpertemperatur und veränderte Hormonprofile beschrieben [43-45].

Der paarige SCN verfügt über etwa 10.000 selbst-oszillierende Neurone pro Seite, die spontane elektrische Aktivität aufweisen [46]. Dies erinnert an

Schrittmacherzellen aus kardialen Gewebe. Interessanterweise folgt die elektrische Aktivität auch einer zirkadianen Rhythmik *in-vivo* [47, 48]. Weitere Untersuchungen bestätigten ein Bestehen der elektrischen Entladungen in Zellkulturen für etwa 9 Tage [49]. Die elektrische Aktivität *in-vitro* zeigte sich hierbei durch die Zeitdauer der Schnittpräparation nicht verändert [50].

Zur Gewährleistung einer übereinstimmenden Synchronisation der Schrittmacherzellen kommunizieren diese über Zell-Zell-Kanäle wie *Gap Junctions* [51]. Im murinen Organismus wirkt das Transmembranprotein Connexin-36 an der Ausbildung der Zell-Zell-Kanäle im SCN mit. In Connexin-36-*knockout*-Mäusen fehlten im SCN elektrische Synapsen, zudem zeigten die Tiere gestörte zirkadiane Aktivität [52]. So lässt sich schlussfolgern, dass elektrische Synapsen an der Entwicklung zirkadianer Prozesse maßgeblich beteiligt sind. Gleichmaßen sind Neurotransmitter im interzellulären Informationsaustausch von großer Bedeutung, gut untersucht sind hier der Transmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) und das Peptidhormon VIP (vasoaktives intestinales Peptid) [49, 53, 54]. Sowohl die Expression von Neuropeptiden als auch die Rhythmizität innerhalb der Neurone des SCN ist heterogen und abhängig von der Lokalisation [55-57].

Afferenzen aus der Retina finden durch den Tractus retinohypothalamicus (RHT) Eingang in den SCN und bilden eine wichtige Grundlage zur Synchronisierung der endogenen Rhythmen mit dem exogenen Tag-Nacht-Rhythmus [58]. Dieser Vorgang wird auch als *Photoentrainment* beschrieben [59]. Abbildung 2 bietet einen Überblick über den SCN als zentralen zirkadianen Rhythmusgenerator und die Koordination peripherer Oszillatoren am Beispiel der Maus (s. u.).

Efferenzen aus dem SCN führen mehrheitlich zu (hypo-)thalamischen Regionen in angrenzender Nähe. Hier sind vornehmlich die subparaventriculäre Zone des Hypothalamus und der Nucleus paraventricularis des Thalamus erwähnenswert [60, 61]. Daneben gibt der SCN Anteile über die *Area praeoptica* im anterioren Hypothalamus in den medialen präfrontalen Cortex ab und kann auf diese Weise „höhere“ Prozesse wie Aufmerksamkeit, Exekutivfunktionen und Bewusstsein modulieren [62, 63].

Weiterhin verlaufen efferente Fasern weiter über den Nucleus dorsomedialis hypothalami (DMH) und zu Kerngebieten im ventromedialen Hypothalamus (Nucleus ventromedialis hypothalami, VMH) [31]. Diese Signale spielen letztlich

über das autonome Nervensystem und das Endokrinum bei der zirkadianen Steuerung des Körpers eine wichtige Rolle [64]. DMH und VMH stellen Bestandteile des *Tuber cinereum* (lat. „grauer Höcker“) dar [65]. Dieses am Grund des dritten Ventrikels befindliche Areal ist an der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Hunger-/Sättigungsgefühls beteiligt [66, 67].

In diesem Zusammenhang ist auch die zirkadiane Fluktuation der Glucocorticoid-Hormonsynthese bedeutsam, deren Höchststand zu Beginn der Aktivitätsaufnahme erreicht wird [68, 69]. Corticosterone als Vertreter der Gruppe der Glucocorticoide sind an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse wie beispielsweise Glucosehomöostase, Elektrolythaushalt sowie Reaktionen gegenüber Stressoren beteiligt. Die Bildung von Corticosteronen unterliegt der Kontrolle des zirkadianen Systems über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN), einem endokrinologischen Regelkreis, und dem autonomen Nervensystem.

Die Freisetzung folgt einem täglich rekurrierenden Muster mit einem pulsatilen Anstieg bei Beginn der Aktivitätsaufnahme [70], bei nachtaktiven Tieren folglich zu Beginn des Abends. Die Synthese des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) als glandotropes Hormon folgt ähnlichen Rhythmen [71]. Über den Blutweg trifft ACTH in der Nebennierenrinde ein und treibt die Biosynthese von Corticosteronen an. Im Jahr 1976 führte Meier Experimente an hypophysektomierten Ratten durch und stellte fest, dass trotz des Fehlens der zyklischen ACTH-Freisetzung durch die Ablation der HHN, eine rhythmische Sekretion von Corticosteronen zu beobachten war [72]. Bei Denervierung der Nebennieren jedoch, war diese Rhythmizität nicht mehr objektivierbar [73]. Dies legte nahe, dass eine neuronale Modulation an der Biosynthese beteiligt ist.

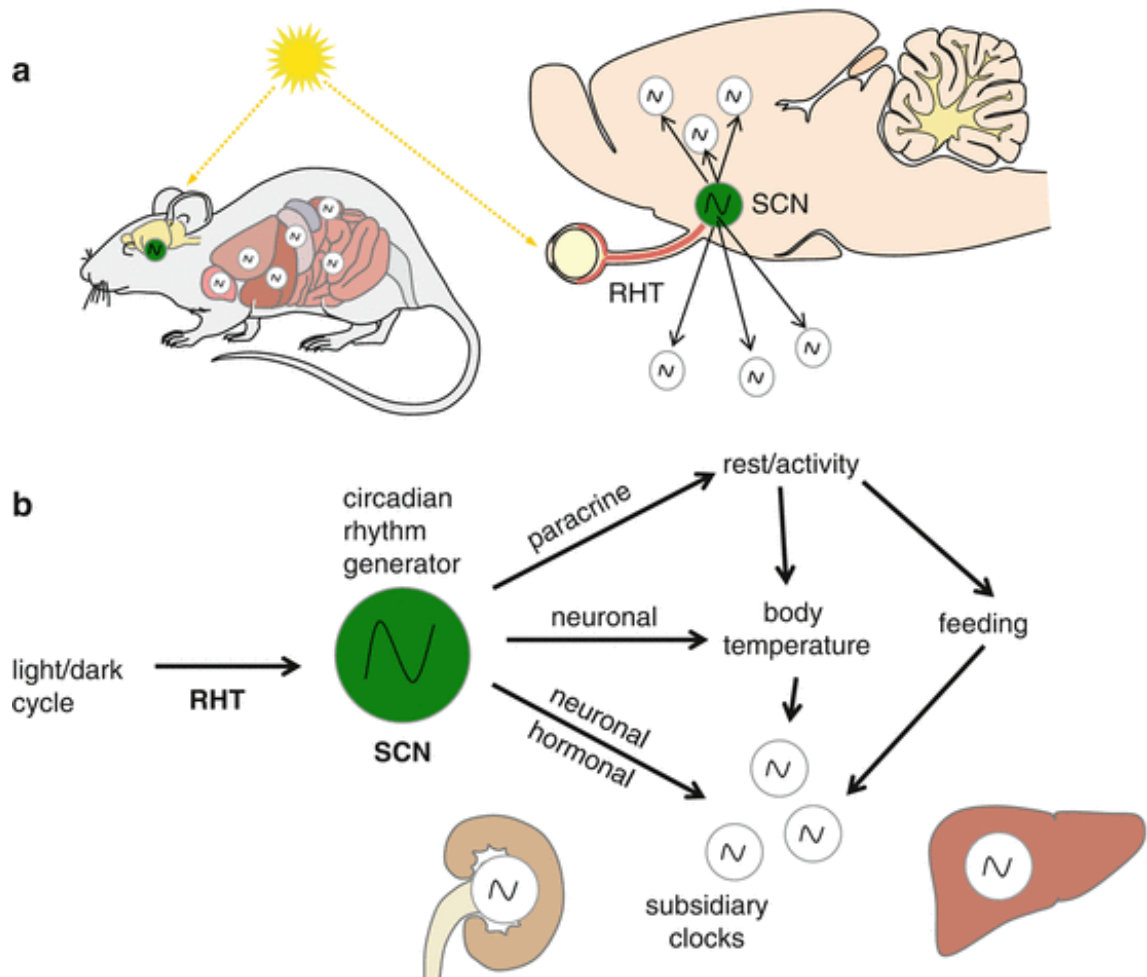


Abb. 2: Das nach Rangordnung organisierte zirkadiane System am Beispiel der Maus. (a, b) Die Grundlage des zirkadianen Systems beruht auf der Kommunikation zwischen dem zentralen zirkadianen Rhythmusgenerator im SCN (grün) und untergeordneten Oszillatoren. Der SCN befindet sich im ventralen Hypothalamus und erhält Informationen über Licht und Dunkelheit über den RHT. Untergeordnete Oszillatoren befinden sich in zahlreichen Geweben und Organen des Organismus. (b) Der zentrale zirkadiane Rhythmusgenerator koordiniert periphere Oszillatoren über unterschiedliche Signalwege. Das Ziel ist eine abgestimmte, rhythmische Abfolge von physiologischen Funktionen und Verhalten. So werden Schlaf und Aktivität über parakrine Signale und daraus resultierend die Nahrungsaufnahme beeinflusst. Schlaf und Aktivität wirken ferner auf die Körpertemperatur ein, die auch durch unmittelbare neuronale Wege moduliert werden kann. Nahrungsaufnahme und Körpertemperatur können neben direkten neuronal-humoralen Kaskaden auf periphere Uhrwerke einwirken (aus [74] mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature).

1.3 Lichtperzeption

Neben den klassischen beiden Photorezeptoren, Stäbchen (*rods*) und Zapfen (*cones*), beinhaltet die Netzhaut von Säugetieren auch retinale Ganglienzellen [27]. Über viele Jahrzehnte schätzte man die Wahrnehmung von Licht als alleinig bewerkstelligt durch Stäbchen und Zapfen ein. In tierexperimentellen Studien an transgenen Mäusen, welche weder intakte Stäbchen noch Zapfen exprimierten, konnte erstaunlicherweise dennoch die Fähigkeit der Photosensitivität festgestellt werden [27, 75]. Erhalten waren physiologische, nonvisuelle (nicht der Bildformung dienende) Funktionen wie beispielsweise der Pupillenlichtreflex [76, 77].

Diese Entdeckungen legten die Überlegung nahe, dass andersartige, *non-rod non-cone photoreceptors* an der Lichtwahrnehmung teilnehmen könnten. Unterdessen ist bekannt, dass es sich hierbei um eine Untergruppe der retinalen Ganglienzellen, so genannte intrinsisch photosensitive retinale Ganglienzellen (ipRGCs) handelt. Die ipRGCs sind auf eine bemerkenswerte Weise dazu befähigt, direkt auf Licht zu reagieren (s. u.) [1, 27, 59]. Insgesamt sind bei Säugern folglich Stäbchen, Zapfen und ipRGCs als drei Klassen von Photorezeptoren an der Wahrnehmung von Licht beteiligt [59, 78, 79]. Eine Übersicht bietet Abbildung 3 (s. u.).

Die Photorezeptoren enthalten Sehpigmente, sogenannte lichtensitive Opsine, organisiert als heptahelikale Transmembranproteine. Die Retina der Maus schließt verschiedene dieser Pigmente ein: Das Rhodopsin als Pigment der Stäbchen mit einem Empfindlichkeitsmaximum bei 498 nm (blaugrün), L- und S-Opsine der Zapfen mit Maxima bei 505 (blaugrün) und 360 nm (UV-Licht) und Melanopsin als Pigment der ipRGCs, welches am empfindlichsten auf Licht mit einer Wellenlänge von 479 nm reagiert, dem blauen Bereich des sichtbaren Lichtspektrums entsprechend [80-82]. Aus diesen Angaben lässt sich folgern, dass Mäuse rotem Licht gegenüber als „unempfindlich“ gelten [83-85].

Licht längerer Wellenlänge (L-Opsin-Aktivierung, „L“ für *long-wavelength*) ist an der Anpassung zirkadianer Rhythmen an externe Lichtverhältnisse („Entrainment“ s. u.) stärker beteiligt als Licht kürzerer Wellenlänge (S-Opsin-Aktivierung, „S“ für *short-wavelength*), insbesondere unter schwacher Beleuchtung [1, 86].

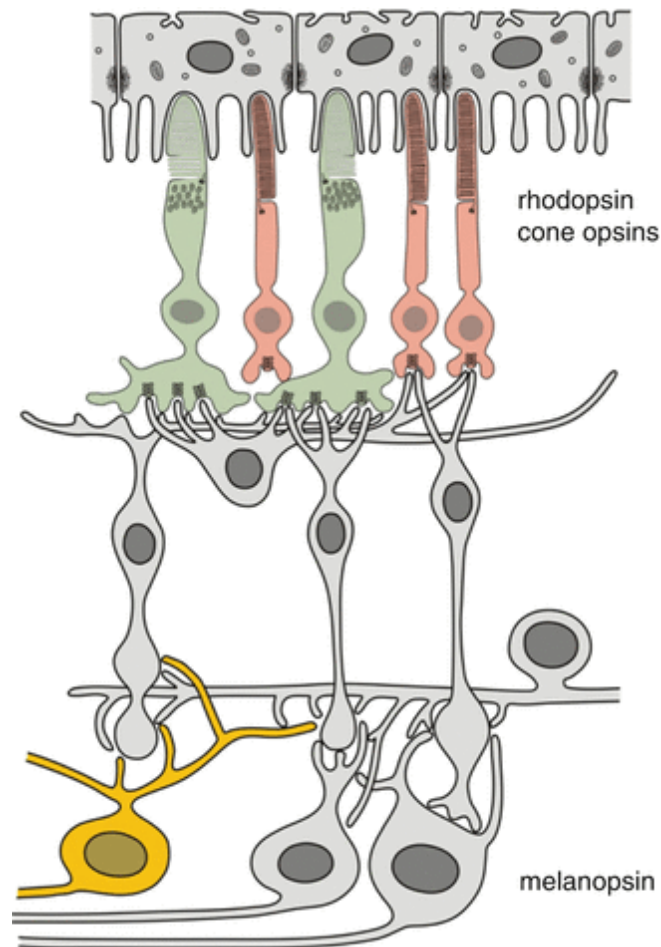


Abb. 3: Illustrierende Abbildung der Retina von Säugetieren mit Darstellung der drei Klassen von Photorezeptoren. Stäbchen (rot), Zapfen (grün) und intrinsisch photosensitive retinale Ganglienzellen (ipRGCs) mit ihrem Photopigment Melanopsin (gelb) wirken bei der Perzeption von Licht mit. Die Axone der ipRGCs vereinigen sich im Verlauf zum RHT und erreichen schließlich den SCN. Die Bezeichnung „zirkadiane Photorezeptoren“ ist für die ipRGCs ebenfalls ein geläufiger Begriff [59] (aus [74] mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature).

Weitere Arbeiten konnten Eigenschaften der Photorezeptoren konkretisieren: So dienen Zapfen vornehmlich zu Beginn der Lichtphase und unter schwachen Bestrahlungsintensitäten der Ausbildung nonvisueller Reaktionen (beispielsweise Pupillenlichtreflex oder Suppression der Freisetzung des schlaffördernden Hormons Melatonin), nach langanhaltender, dauerhafter und stärkerer Bestrahlung ist es besonders das Melanopsin [87-90].

Es ist bekannt, dass langwelliges Licht das zirkadiane System von Säugern stärker beeinflusst als Licht kürzerer Wellenlänge [1, 91]. So hat langwelliges Licht (im sichtbaren Spektrum gelb) das Potenzial, zirkadiane Periodendauern zu verlängern und ist wirksamer im Re-Entrainment (s. u.) des zirkadianen Systems [1, 86].

Dies erscheint sehr sinnvoll, wenn man die Verhältnisse während der Dämmerung skizziert. Hierbei verändert sich nicht nur die „Farbe“ des Lichtes, sondern auch die Bestrahlungsstärke [92]. Das zirkadiane System ist zu diesem Zeitpunkt besonders empfindlich gegenüber Veränderungen der Dauer von Licht und Dunkelheit, die Beleuchtungsintensität nimmt ab, während sich das Farbspektrum weiter in Richtung Licht längerer Wellenlänge verschiebt [1, 93].

Die Axone der ipRGCs bilden schließlich den RHT und projizieren monosynaptisch glutamaterg und über das Neuropeptid PACAP (*pituitary adenylate-cyclase-activating peptide*) in den vlSCN [27, 58]. Glutamat wird nach vorausgehender Depolarisation durch Licht aus den Axonendigungen freigesetzt und bindet an ionotrope NMDA- und AMPA-Rezeptoren mit Aktivierung weiterer Signalwege in den SCN-Neuronen [94, 95]. Der vlSCN empfängt ferner indirekt Afferenzen über den Tractus geniculohypothalamicus (GHT) aus dem *intergeniculate leaflet* des Corpus geniculatum laterale (CGL) [96]. Das CGL selbst ist ein im Diencephalon lokalisiertes Kerngebiet, welches als eine zentrale Verschaltungsstelle der visuellen Sehbahn fungiert [97]. Über die Verbindung mit dem GHT können zirkadiane Rhythmen moduliert werden [98].

Auf den Eingang der Lichtinformationen in das zirkadiane System folgt eine Reaktionskette im molekularen Uhrwerk der Neurone des SCN.

1.4 Das molekulare Uhrwerk

Erste Erkenntnisse der molekularen Mechanismen konnten durch Studien an der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) gewonnen werden. Identifizierte Allele wurden als „*period gene*“ bezeichnet [99]. Neuronale Kreisläufe mit Einflussnahme auf das Timing der lokomotorischen Aktivität und die Regulation von Schlaf wurden nach und nach entschlüsselt [100, 101]. Für die Entdeckung der molekularen Grundlagen zirkadianer Rhythmen in dieser Gattung wurden drei Chronobiologen im Jahr 2017 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet [102].

1997 gelang es erstmals, die entsprechenden Genhomologe bei Säugetieren zu identifizieren [103, 104]. Die Nuclei suprachiasmatici bilden ein molekulares Uhrwerk und werden durch autoregulatorische negative und positive transkriptional-translationale Rückkopplungsschleifen aus so genannten Uhrengenen beeinflusst [2, 28]. Diese Rückkopplungsschleifen finden sich in allen zirkadianen Oszillatoren in nahezu allen Körperzellen. Sie bilden die Grundlage für eine rhythmische Genexpression, die wiederum eine rhythmische Zell- und schließlich Organfunktion anstößt.

Die Transkriptionsfaktoren CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) und BMAL1 (*Brain and Muscle ARNT-like 1*) fusionieren im Zytoplasma zu BMAL1:CLOCK-Heterodimeren und werden daraufhin in den Zellkern transloziert [105, 106]. Als Struktur weisen beide Transkriptionsfaktoren ein Helix-Loop-Helix-Motiv auf, welches die Zusammenlagerung und die Bindung an die DNS ermöglicht [105, 107].

Im Zellkern stimulieren sie durch Bindung an E-box-Elemente der Promotorregionen von Zielgenen die Transkription von Per1, Per2 und Per3 (*Period*) sowie Cry1 und Cry2 (*Cryptochrome*) mRNAs [108]. PER und CRY wiederum, inhibieren nach Erreichen einer bestimmten Konzentrationsmenge ihre eigene Transkription im Sinne einer negativen Rückkopplung [109]. Diese so genannten „Uhrenproteine“ bilden die Basis für die in Kapitel 1.2 beschriebene autonome zirkadiane Oszillationsfähigkeit der Neurone des SCN [110, 111].

Per1, 2 und 3 (*period circadian protein homolog 1, 2 and 3*) sind Gene, die für gleichnamige Proteine kodieren. Sie unterliegen, wie oben aufgeführt, einer rhythmischen Transkription und spielen eine große Rolle in der Bildung sowie Licht-induzierten Modulation (vgl. Kapitel 1.4.1) zirkadianer Rhythmen [103, 112]. Die Gene Cry1 und 2 werden ebenfalls rhythmisch transkribiert und sind unabdingbar für die Erhaltung und Generierung zirkadianer Aktivität [113, 114]. Diesbezüglich ist erneut hervorzuheben, dass dieses Uhrengebilde nicht nur intrazellulär im SCN präsent ist, sondern auch in weiteren zentralen Orten wie in der Retina und in zahlreichen peripheren Geweben [115]. So konnten beispielsweise auch in Zelllinien von Fibroblasten oszillatorische Eigenschaften beobachtet werden [116].

Mutationen im Clock-Gen bei Mäusen gehen mit Veränderungen des zirkadianen Verhaltens einher [117]. Die Homozygotie bedingt sogar eine Arrhythmie

unter dauerhafter Dunkelheit (ebd.). Dem Bmal1-Gen wird auch in der Ätiopathogenese von arterieller Hypertension, Diabetes Typ II und Störungen der Glucosehomöostase eine Bedeutung beigemessen [118, 119].

1.4.1 Entrainment und Masking

Die „innere Uhr“, die selbst eben einen Oszillator abbildet, ist in der Lage, sich nach exogenen Stimuli aus der Umwelt auszurichten [120]. Diese Stimuli werden in der Chronobiologie als *Zeitgeber* bezeichnet, ein Terminus, der durch den deutschen Physiologen Jürgen Aschoff in den 1950er-Jahren etabliert und auch im englischsprachigen Raum so übernommen wurde [121]. Neben dem effektivsten Zeitgeber Licht, welches die Periodenlänge endogener, zirkadianer Rhythmen an den Tag-Nacht-Rhythmus anpasst, können auch weitere Faktoren wie beispielsweise Klima, Temperatur oder soziale Interaktion als Zeitgeber und dadurch als Modulator dienen [120, 122, 123].

Man spricht in diesem Sinne von *Entrainment*. Entrainment gibt demzufolge die Synchronisation sich selbsttragender Oszillatoren durch Zeitgeber an. Zeitgeber „entrainen“ den Rhythmus der Organismen, Licht „entraint“ über den RHT die zirkadiane Uhr an den Tag-Nacht-Zyklus [58, 124].

Informationen über Licht und Dunkelheit werden retinal detektiert und über die Neurotransmitter PACAP und Glutamat zum SCN fortgeleitet [27, 125, 126]. Über Signalkaskaden kommt es zur Phosphorylierung vom Transkriptionsfaktor CREB [127-129] und ELK1, sowie den Kinasen ERK1/2 [130], wodurch letztlich die CRE-abhängige Aktivierung von Per angestoßen wird. Die so induzierte Per-Expression führt zur entsprechenden Einstellung des molekularen Uhrwerks [28].

Der Begriff des Entrainments ist vom *Masking* zu unterscheiden: Entrainment setzt einen intakten Rhythmusgenerator voraus. Masking geht auf direkte, unmittelbare Einflüsse durch Licht oder andere Stimuli zurück, visualisierbar wie eine Antwortmöglichkeit des Organismus, die die Periodenlänge des zirkadianen Schrittmachers nicht beeinflusst [124]. Beide Prozesse ergänzen einander. Aktuell ist noch nicht verstanden, ob Masking etwa durch die Lichteinflüsse selbst, durch den SCN oder aufgrund wechselwirkender nachgeschalteter Nuclei erzeugt wird [131]. Selbst Mäuse mit defektem molekularem Uhrwerk (s. u.) weisen Masking auf [132]. Wenn das Masking defekt ist, deutet dies möglich-

erweise auf eine gestörte Lichtperzeption hin. Bei nachtaktiven Lebewesen, wie der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Maus, beschreibt positives Masking eine Aktivitätssteigerung durch Dunkelheit und negatives Masking eine Dämpfung durch Licht (*vice versa* bei diurnalen Lebewesen) [133]. Erstaunlicherweise verfügen Mäuse ohne intakte Stäbchen, Zapfen und ipRGCs mit Melanopsin über kein Entrainment, kein Masking und keinen signifikanten Pupillenlichtreflex [134].

Eine gezielte Deletion des Uhrgens *Bmal1* (*Bmal1*^{-/-}) hat bei Mäusen eine Störung des Uhrwerks zur Folge [135]. In Untersuchungen konnten hierbei Veränderungen zirkadianer Prozesse ermittelt werden, die Tiere wiesen unter anhaltender Dunkelheit arrhythmisches Verhalten auf [135]. Zudem stellte sich heraus, dass die Lichtperzeption kompromittiert ist [136, 137]. Daneben zeigen die Tiere eine vorzeitige Alterung bei kürzerer Lebenserwartung mit einer Häufung Alters-assoziiierter Erkrankungen. Bei retina-spezifischer Deletion des Gens nimmt die Sehkraft der Mäuse durch Degeneration von Photorezeptoren ab, auch ist die Entwicklung der Retina eingeschränkt [136]. Zudem ist die retinale Schichtdicke herabgesetzt [136]. Die Lebensfähigkeit der Zapfen ist hierbei, besonders bei älteren Mäusen, reduziert [1, 136]. Baba et al. folgerten daraufhin, dass eine gestörte zirkadiane Uhr den Rückgang visueller Eigenschaften im Alter begünstigen kann (ebd.). Infolgedessen untersuchten wir in unserer Studie Mäuse im Alter von 30 Lebenswochen, da sich in dieser Zeitspanne bei *Bmal1*^{-/-} Tieren Erkrankungen und Symptome vorzeitiger Alterung wie beispielsweise Sarkopenie, Multiorganatrophie oder Katarakt manifestieren [137]. Daher finden *Bmal1*^{-/-} Mäuse häufig Anwendung in experimentellen Szenarien zu retinalen Funktionsstörungen.

1.5 Environmental Enrichment

Bestimmte wissenschaftliche Fragestellungen erfordern eine Einzelhaltung von Tieren. Die dadurch resultierende Isolation stellt einen großen Stressor für normalerweise in Sozialverbänden lebende Tiere wie Mäuse dar und geht mit Veränderungen des Verhaltens, des neuroendokrinen Systems und des Allgemeinzustandes einher [138-140]. Zugleich kann die Entstehung psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen wie Angststörungen, Epilepsie oder Amnesie angestoßen werden [139]. Abnormes repetitives Verhalten kann die Folge eines

Lebens in einer abgetrennten Umwelt sein, welches insbesondere in behavioralen Experimenten zu einer verminderten Validität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führen kann [141]. Zu den pathophysiologischen Konsequenzen gehören auch Abwandlungen der Synthese von Neurotransmittern wie beispielsweise Serotonin und Dopamin [139]. Ferner konnten das Vorliegen von oxidativem und nitrosativem Stress sowie Störungen im Opioidsystem objektiviert werden [139].

In wissenschaftlichen Tierhaltungen bestehen daher bestimmte Vorgaben aus Tierschutzrichtlinien. So sollen Labortiere nach Möglichkeit in Gruppenhaltung leben, um das Auftreten von Isolationsstress zu begrenzen. Gleichwohl ist das Platzangebot maßgeblich. Verschiedene Komponenten wie Belichtungsstärke, Dauer der Lichtperiode, Wasser- und Nahrungsangebot, Käfiggröße sowie das Gewicht der Tiere werden in zahlreichen Studien im Hinblick auf ihre Auswirkungen beleuchtet [142-144].

Empfohlen ist der Einsatz bestimmter Materialien, die eine Unterforderung und Unterbeschäftigung der in Haltung lebenden Tiere vermeiden sollen, insbesondere bei Tieren in Einzelhaltung [145]. Diese werden als *(behavioral-) environmental Enrichment* bezeichnet. Gleichmaßen wird vornehmlich bei Labornagern zu der Bereitstellung von Nestbaurohstoffen geraten [146]. Daten aus Studien weisen darauf hin, dass die Verwendung dieser Maßnahmen zu einer höheren Resilienz der Versuchstiere führen kann [147]. Enrichment findet auch Anwendung in zoologischen Gärten lebenden Tieren. Carlstead und Shepherdson beschrieben 1994, dass Enrichment durch die Minderung von Stress und dem Aufbau eines kontaktfreudigeren Verhaltens für die Reproduktion von Zootieren förderlich sein kann [148].

Mäuse sind hochsoziale Lebewesen, die in Gruppen interagieren [149]. Die Gruppenhaltung ist daher ein bedeutsamer Grundsatz, man spricht in diesem Sinne von „sozialem Enrichment“ [150]. Enrichment umfasst etwa neben Modifikationen der Laborkäfige von Mäusen auch die Bereitstellung von Nestbaumaterialien wie zum Beispiel Baumwollfasern oder Zellstoff. Eingesetzt werden vor allem bei Mäusen beispielsweise kleine Tunnel oder Häuschen aus rotem transparenten Polycarbonat, die den Tieren als Rückzugsmöglichkeit, Schlafplatz und Ort der Geborgenheit dienen. Mäuse sehen kein rotes Licht (s. o.), für sie erscheint es im Häuschen grau bis dunkel - ein geeigneter Unterschlupf für

die nachtaktiven Nager [83]. Daneben soll natürliches Verhalten gefördert werden [151]. Gleichzeitig ermöglichen sie durch die Transparenz eine Sichtbarkeit der Tiere durch die Tierpfleger*innen. Auch sind diese Häuschen leicht autoklavierbar.

Hierbei wird ein Zwiespalt deutlich: Die Einflüsse der Enrichment-Maßnahmen auf Standardisierungsansprüche, sowie eine etwaige Gefährdung erhobener Daten sind nicht hinreichend bekannt. So wird in der Literatur auf die potenziell verringerte Reproduzierbarkeit von Resultaten bei selbst geringer Veränderung der Haltungsumwelt hingewiesen [152]. Tsai et al. wiesen in einer Studie an Mäusen darauf hin, dass Enrichment die Variabilität innerhalb von Versuchsgruppen beeinflussen kann [153]. Zudem machten sie darauf aufmerksam, dass eine hierdurch verursachte breitere Streuung der Daten eine erhöhte Anzahl an erforderlichen Versuchstieren hervorrufen kann, um die erforderliche Trennschärfe in der statistischen Testung zu gewährleisten (ebd.). Darüber hinaus stellt sich dieses mögliche Erfordernis unvereinbar mit dem „3R-Prinzip“ (s. u.) dar.

Im Kontrast hierzu bestehen Überlegungen, ob Enrichment durch Bemühungen, sich den natürlichen Lebensweisen der Tiere anzunähern, nicht doch plausible und authentischere Ergebnisse herbeiführen kann (einen umfangreichen Überblick hierzu bietet Kathryn Bayne) [154]. Es herrscht auch das Postulat, dass gute wissenschaftliche Praxis mit zufriedenen Tieren einhergehen soll, so nahe wie möglich an der regulären Physiologie des untersuchten Tieres [155]. Enrichment bildet ein umstrittenes Themenfeld in der Versuchstierkunde ab. Es gilt, die Richtlinien umzusetzen, allerdings gibt die Gesetzeslage (s. u.) allenfalls orientierend Maßgaben vor. Die genaue Ausgestaltung obliegt schließlich den jeweiligen Städten und Kreisen mit ihren zugeordneten Aufsichtsbehörden. Der externe Rahmen, der auch durch laborwirtschaftliches Planen und Handeln mitgestaltet wird, gibt Kosteneffizienz vor. Das RH hat sich als ein guter Kompromiss zwischen den Enrichmentvorgaben und der Käfighaltung hervorgehoben. Es ist ökonomisch, praktikabel, recyclebar und daher in vielen Forschungseinheiten weltweit verbreitet. Durch die Transparenz des Hauses ist außerdem eine Sichtbarkeit und ein regelmäßiges Check-Up durch die Untersuchenden sichergestellt [156].

1.5.1 Das 3R-Prinzip

Bereits 1959 führten William Russel und Rex Burch in ihrem Buch „*The principles of Humane Experimental Technique*“ die Begriffe „*replacement, reduction and refinement*“ (z. Dt.: Vermeidung, Verringerung und Verfeinerung) im Sinne eines anerkannten Prinzips zum ethisch verantwortungsvollen Umgang mit Tieren in biomedizinischer Forschung ein [157]. Geläufig ist dieser Ansatz unter dem „3R-Prinzip“.

Replacement umschließt hierbei alle wissenschaftlichen Vorhaben, die den Einsatz bewusster höherer Lebewesen umgehen. Russel und Burch benennen etwa die Nutzung von Pflanzen, Mikroorganismen und Endoparasiten, denkbar sind ebenso Zellkulturen oder die Inanspruchnahme künstlicher Intelligenz [158]. Daneben beschreibt *reduction* grundsätzlich eine Verringerung der Anzahl der Tiere, realisierbar durch ein ausführlich vorbereitetes Studiendesign durch entsprechende vorangehende statistische Tests. Die dritte Devise, *refinement*, findet Anwendung in den nach *replacement* und *reduction* im Forschungsvorhaben eingeschlossenen Tieren. Die „Verfeinerung“ drückt die Vermeidung von Leid, Schmerz und Stress, sowie eine Optimierung der Haltungsumwelt aus. Die Verwendung ausreichender und geeigneter Narkotika sowie Analgetika bei Interventionen ist an dieser Stelle ebenfalls dem *refinement* zuzuordnen [159].

Environmental Enrichment stellt eine wichtige Säule des dritten Prinzips dar und wird gesetzlich festgehalten (s. u.). Ziel ist, wie in Abschnitt 1.5 dargestellt, die Steigerung des Wohlbefindens der Versuchstiere und die Förderung artgemäßen Verhaltens.

1.5.2 Gesetzeslage

Die rechtlichen Vorgaben zur Haltung von Tieren für wissenschaftliche Fragestellungen sind aus dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland (TierSchG), der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV), sowie der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates, und den Empfehlungen der EU-Kommission (2007/526/EG) abzuleiten.

Gemäß Paragraph 1 des deutschen Tierschutzgesetzes gilt: „Zweck dieses Gesetzes ist es, aus der Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitge-

schöpf dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen. Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen“. Ebenso gilt weiter für Versuchstiere, dass ihnen zukommende Schmerzen und Leid auf ein Mindestmaß zu begrenzen sind (§ 7 Absatz 1 Satz 2 TierSchG).

Die in der EU geltenden Vorgaben (s. o.) plädieren grundsätzlich für die Implementation der 3R-Prinzipien in der Tierhaltung. Inzwischen wird wissenschaftlich aufgearbeitet, ob und inwiefern diese Maßgaben in der Realität Abbild finden [160]. In der Literatur wird dies als „*research on research*“ formuliert [161]. Der Europarat spricht sich in seinem aktuellen Entwurf zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere ausdrücklich für den Einsatz von Enrichment-Maßnahmen bei Labormäusen aus. An dieser Stelle werden auch ausdrücklich Rückzugsräume und Nestbaumaterialien benannt (vgl. SEV Nr. 123).

Daneben heben die Empfehlungen der europäischen Kommission Folgendes besonders hervor: „*Consideration should be given to the potential impact of the environmental and social enrichment programmes, on the outcome of scientific studies, in order to avoid the generation of invalid scientific data and consequential animal wastage*“ (Official Journal of the European Union, 2007/526/EG, document number C(2007) 2525, Kapitel 4.5.1, Absatz 2). Die etwaige Einflussnahme von Enrichment-Maßnahmen sei bei wissenschaftlichen Fragestellungen also streng in Betracht zu ziehen.

Die Gesellschaft für Versuchstierkunde beschreibt explizit die „*Besorgnis einer Konterkarierung von bisherigen Standardisierungserfolgen*“ (GV-SOLAS, Ausschuss für tiergerechte Labortierhaltung, „Tiergerechte Haltung von Labormäusen“, August 2014). Studienergebnisse aus 2012 deuteten an, dass Enrichment, gemäß den Vorschriften aus 2010/63/EU, Resultate in Fragestellungen bezüglich Verhalten oder pharmakologischen Wechselwirkungen verfälschen könnte [162].

Die europäische Kommission widmet dem Themenkomplex Enrichment in ihren Empfehlungen ein gesamtes Kapitel. Haltungsräume sollen den Tieren „hinreichende Komplexität“ zur Verfügung stellen (ebd.). Der moderne Standardkäfig enthält heute also - natürlich abhängig von Studiendesign und Kontextfaktoren - Futter und Wasser *ad libitum*, Streu, Nestbaumaterialien und ein Häuschen. Das rote Haus (RH) stellt zusammenfassend einen Bestandteil von zahlreichen

Empfehlungen bezüglich Tierschutzvorgaben der europäischen Union dar. Abbildung 4 bietet eine exemplarische Darstellung einer in unserer Studie untersuchten Maus in Einzelhaltung mit Anwendung des RH. Allerdings ist es an dieser Stelle wichtig zu berücksichtigen, dass das verwendete rot-durchsichtige Plastik Licht kurzer Wellenlänge herausfiltert, welches für das Entrainment zirkadianer Rhythmen erforderlich ist (s. o.). So liegt die Frage nicht fern, ob Versuchstiere, die unter Verwendung dieses Enrichments, die erforderliche Gegebenheit von standardisierten Bedingungen tatsächlich aufweisen können.



Abb. 4: Maus in Einzelhaltung. RH im Hintergrund erkennbar. Auf dem Käfig (standardisierter *type 2 short cage*) befindet sich ein Aufsatz mit einem Infrarot-Detektor (Mouse-E-Motion, Hamburg, Germany) zur Registrierung und kontinuierlichen Aufzeichnung spontaner lokomotorischer Aktivität. Futter und Wasser ad libitum.

1.6 Tierversuchsgenehmigung

Eine Tierversuchsgenehmigung mit dem Aktenzeichen 84.02.04.2012 A102 wurde für die Durchführung der experimentellen Fragestellungen erteilt.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Die Bereitstellung von Enrichment im tierexperimentellen Kontext kann sowohl Effekte auf die untersuchten Individuen als auch auf die Studienergebnisse ausüben. In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, ob die Anwendung des roten Hauses als verbreitete Enrichment-Maßnahme in der Labortierhaltung die rhythmische Aktivität in Bmal1-/- Mäusen beeinflusst. Diese transgenen Tiere werden nicht ausschließlich in wissenschaftlichen Fragestellungen zu vorzeitiger Alterung oder gestörten zirkadianen Funktionen eingebunden [137]. Vielmehr werden Bmal1-/- Mäuse in der Forschung in verschiedenste Sachgebiete herangezogen, beispielsweise den Glucosemetabolismus oder Reproduktion und Infertilität betreffend [163, 164].

Umso wichtiger erscheint es, eine mögliche Einflussnahme des RH auf diese Tiergruppe zu analysieren und Erkenntnisgewinne in zukünftigen Studiendesigns kritisch zu berücksichtigen. Wie in unserer Veröffentlichung beschrieben, veränderten wir longitudinal die Lichteinstellung in den Versuchsräumen und hielten die spontane lokomotorische Aktivität der Tiere kontinuierlich via Infrarot-Detektoren (s. Abb. 4) fest. Dies ermöglichte uns, das Verhalten der Tiergruppen in Form von Aktogrammen zu visualisieren.

Ein weiterer Anspruch dieser Arbeit ist die Klärung der Frage, ob durch das RH Auswirkungen auf der zellulären Ebene entstehen und diese zu detektieren sind. Hierzu teilten wir die Tiere in zwei Subgruppen ein. Eine Gruppe wurde zwei Stunden nach dem Beginn der Lichtepisode (ZT02), die andere 2 Stunden nach dem Ende (ZT14) getötet. Im Anschluss an eine transkardiale Perfusion mit Formalin wurden die Hirne in toto entnommen und am Kryostaten in koronarer Ebene geschnitten. Durch Immunhistochemie stellten wir die Expression vom Uhrgen Per1 und vom Protein p-ERK in den Wildtyp- und Bmal1-/- Mäusen mit und ohne RH dar. Beide Marker werden bekannterweise zirkadian exprimiert, ein Gesichtspunkt, der uns für die Annäherung an die molekularen Einflüsse des RH tauglich erschien [112, 130]. Zudem wird die Bildung durch Lichtexposition angeregt [130].

Unser Studiendesign legte zudem die Klärung der Frage nahe, ob das RH als Maßnahme zur Steigerung des Wohlbefindens dienen kann. Zu diesem Zwecke analysierten wir die Corticosteron-Level im Serum, da diese einen sachdienli-

chen Indikator für die Stressbelastung der Versuchstiere abbilden [165]. Dies findet bereits Einsatz in der Objektivierung der Auswirkungen und Effektivität von Tierhaltungsmaßnahmen [166].

Wie in Kapitel 1.5.2 beschrieben, geben bereits einige Arbeiten Hinweise auf modifizierte Resultate unter dem Einsatz von Enrichment. Durch die erhobenen Daten erhoffen wir uns, bislang nicht ausreichend untersuchte Auswirkungen zu rekonstruieren. Wir streben an, diese Ergebnisse in Planungen von weiteren Forschungsvorhaben, insbesondere an Bmal1-/- Mäusen, zu integrieren.

2 Does a Red House Affect Rhythms in Mice with a Corrupted Circadian System? Öztürk, M., Ingenwerth, M., Sager, M., von Gall, C., Ali, A.A.H., International Journal of Molecular Sciences, 22(5), 2288, (2021)



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Does a Red House Affect Rhythms in Mice with a Corrupted Circadian System?

Menekse Öztürk ¹, Marc Ingenwerth ^{1,2}, Martin Sager ³, Charlotte von Gall ^{1,*} and Amira A. H. Ali ^{1,†}

¹ Institute for Anatomy II, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany; menekse.oeztuerk@hhu.de (M.Ö.); Marc.Ingenwerth@uk-essen.de (M.I.); amira.ali@med.uni-duesseldorf.de (A.A.H.A.)

² Institute of Pathology, Medical Faculty, University Duisburg-Essen, Hufelandstrasse 55, 45147 Essen, Germany

³ Central Institute for Animal Research and Animal Protection (ZETT), Medical Faculty, Heinrich Heine University, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany; Martin.Sager@med.uni-duesseldorf.de

* Correspondence: Charlotte.Gall@uni-duesseldorf.de; Tel.: +49-(0)211-81-15044; Fax: +49-(0)211-81-15046

† Authors equally contributed.



Citation: Öztürk, M.; Ingenwerth, M.; Sager, M.; von Gall, C.; Ali, A.A.H. Does a Red House Affect Rhythms in Mice with a Corrupted Circadian System?. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2288. <https://doi.org/10.3390/ijms22052288>

Academic Editor: Felino R Cagampang

Received: 20 January 2021
Accepted: 24 February 2021
Published: 25 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The circadian rhythms of body functions in mammals are controlled by the circadian system. The suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus orchestrates subordinate oscillators. Time information is conveyed from the retina to the SCN to coordinate an organism's physiology and behavior with the light/dark cycle. At the cellular level, molecular clockwork composed of interlocked transcriptional/translational feedback loops of clock genes drives rhythmic gene expression. Mice with targeted deletion of the essential clock gene *Bmal1* (*Bmal1*^{−/−}) have an impaired light input pathway into the circadian system and show a loss of circadian rhythms. The red house (RH) is an animal welfare measure widely used for rodents as a hiding place. Red plastic provides light at a low irradiance and long wavelength—conditions which affect the circadian system. It is not known yet whether the RH affects rhythmic behavior in mice with a corrupted circadian system. Here, we analyzed whether the RH affects spontaneous locomotor activity in *Bmal1*^{−/−} mice under standard laboratory light conditions. In addition, mPER1- and p-ERK-immunoreactions, as markers for rhythmic SCN neuronal activity, and day/night plasma corticosterone levels were evaluated. Our findings indicate that application of the RH to *Bmal1*^{−/−} abolishes rhythmic locomotor behavior and dampens rhythmic SCN neuronal activity. However, RH had no effect on the day/night difference in corticosterone levels.

Keywords: circadian; mammalian; suprachiasmatic nucleus; entrainment; synchronization; red house; *Bmal1*; masking

1. Introduction

In mammals, many body rhythms, such as the sleep-wake cycle or hormone secretions, oscillate within a period of approximately 24 h under constant environmental conditions—this is called a circadian rhythm. These circadian rhythms are orchestrated by a circadian rhythm generator, which is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus [1]. The SCN receives information about the environmental time via the retina and controls rhythmic bodily functions via the autonomous nervous system and the endocrine system. Glucocorticoids such as corticosterone show a circadian fluctuation peaking at the beginning of the activity phase [2,3] and play an important role in coordinating circadian oscillators within the body. In addition, plasma corticosterone is a reliable indicator of stress in mice [4]; therefore, it is used in animal welfare evaluations [5].

The intracellular clock mechanism that drives rhythmic gene expression, and thus rhythmic cell and organ function, is based on interacting positive and negative transcriptional-

translational feedback loops of clock genes [6]. Two basic helix-loop-helix (bHLH)/PAS-containing transcription factors, CLOCK and BMAL1, provide the basic drive to the system by activating transcription through E box enhancers [7,8]. CLOCK:BMAL1 heterodimers drive the transcription of three period genes (*mPer1–3*) and two cryptochrome genes (*mCry1–2*) [7,9,10]. The *mPER* and *mCRY* proteins form complexes, which translocate to the nucleus and interact with CLOCK:BMAL1 heterodimers to inhibit transcription, thus closing the feedback loop [11]. This clockwork is not only present in SCN cells, but also in the retina and other brain regions, as well as peripheral tissues. The retina clock [12,13] controls various aspects of retinal development and photoreceptor viability [14,15], as well as retinal physiology [16].

Light is the most effective zeitgeber [17]; it entrains the period length and the phase of circadian rhythms to the environmental light/dark (LD) cycle [6]. Light/dark information received by the eye is conveyed to the SCN by glutamate and pituitary adenylylate cyclase-activating peptide (PACAP) [18,19]. Activation of the respective receptors induces signal transduction pathways, resulting in the phosphorylation of the transcription factor CREB [20–22] and the kinases ERK1/2 [23], and then the subsequent light-induced CRE-dependent activation of *Per* expression leads to adjustment of the SCN molecular clockwork [24]. Moreover, masking of light and darkness can override or alter the influence of the circadian timekeeping system on behavior and physiology and play an important role in shaping the daily pattern of activity. Nocturnal animals generally become more active in response to darkness (positive masking) and less active in response to light (negative masking) [25,26]. It is still a matter of debate whether masking is modulated by SCN output to downstream hypothalamic nuclei, or by a direct effect of light on activity [27]. Circadian photoentrainment behavior of den dwelling nocturnal rodents is illustrated most impressively by experiments using a simulated den [28]. In a simulated den, the animals have access to a dark box containing nesting material and an activity box with a running wheel which can be illuminated; both compartments are connected by a porthole. In this setting, the animals spend their entire rest period (approximately 12 h) in the dark box. Upon arousal, they leave the dark box to actively sample light information from the porthole. In darkness, they enter the activity box and initiate wheel running. Light at arousal time results in a retreat to the dark box and a phase delay in activity onset on subsequent days. This experiment emphasized the desire of the animals to expose themselves to light as little as possible, and as much as needed.

Three retinal photoreceptor classes—the rods, the cones, and the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs)—contribute light information to the circadian system [29–31]. The ipRGCs encode ambient light (irradiance) for the circadian system and are activated both by their intrinsic melanopsin-dependent phototransduction cascade and by the rods and cones [32]. The mouse retina contains different visual pigments: the rod opsins with a peak sensitivity at 498 nm, the L- and the S-cone opsins with a peak in sensitivity at 505 and ~360 nm, respectively, and the ipRGCs pigment melanopsin, with a peak in sensitivity at 484 nm [33]. While melanopsin appears to be the primary photopigment produced in response to long-duration light exposure and at higher irradiances, cone photoreceptors contribute substantially to nonvisual responses at the beginning of light exposure and at lower irradiances [34]. Consistently, longer-wavelength light has a stronger effect on the mammalian circadian system than short-wavelength light, as light with a higher wavelength (yellow) lengthens the circadian period reliably and is more effective at re-entraining the circadian system as compared to light with a shorter wavelength (blue) [35]. This is expedient, as during twilight, when the circadian system is especially sensitive to changes in the length of the light and the dark phase during the seasons, the intensity of the illumination decreases and the spectral composition shifts towards longer wavelengths [36].

In mice with a targeted deletion of the essential clock gene *Bmal1* (*Bmal1*^{−/−}), the molecular clockwork is disrupted and the mice are arrhythmic in constant darkness [37]. *Bmal1*^{−/−} mice show various aspects of premature aging and a reduced lifespan (around

9 months) [38]. Importantly, in *Bmal1*^{−/−} mice, the light input into the circadian system is compromised [14,39,40]. Electroretinography in mice with a retina-specific deletion of *Bmal1* show a reduction in b-wave amplitudes under both light- and dark-adapted conditions [14,41], indicating that visual information processing in both the rod and cone pathways is affected [14]. This also resembles the phenotype of mice lacking melanopsin [41], the photopigment of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. Moreover, removal of *Bmal1* from the retina affects morphology, accelerates the decline of visual functions during aging, and reduces the viability of cone photoreceptors [14]. Thus, aged *Bmal1*-deficient mice are a well-established model for severely affected retinal function.

Constant efforts are being made to improve animal welfare and housing conditions of laboratory animals [42–45], including their growth, physiological parameters (e.g., hormones), and behavioral activity [46]. Accordingly, application of nesting materials or objects that provide a secure location and a dark place, such as the red house (RH) [46,47], have been widely introduced. However, the RH is not comparable to a den, as it does not allow the animals to move within it. More importantly, the RH is not a dark box, but is illuminated with light at a low irradiance and long wavelength—conditions resembling twilight light conditions, which are now known to affect the circadian system. Thus, validation is required to avoid interference with experimental outcomes. Therefore, we tested whether the application of the RH affects rhythmic locomotor activity and rhythmic SCN neuronal activity and day/night changes in corticosterone levels in wildtype and *Bmal1*^{−/−} mice, which are more prone to perturbations of the light regime.

2. Results

2.1. Spontaneous Locomotor Activity Is Affected by RH

Under constant light (LL), circadian spontaneous locomotor activity was disrupted in both genotypes. In *Bmal1*^{+/+} mice, the power of the 24-h phase gradually decreases during the first 10 days in LL (Figure S1B). In *Bmal1*^{−/−} mice, the power of the 24-h phase was significantly lower in the RH group than the control group (Figure S1C). This shows that the RH enhances the effect of constant light on rhythm instability in *Bmal1*-deficient mice. In *Bmal1*^{+/+} mice, there was no difference in total activity between control mice (*n* = 12: 6 female and 6 male) and mice with the RH (*n* = 11: 6 female and 5 male). However, in *Bmal1*^{−/−} mice, total locomotor activity was reduced in mice with the RH as compared to controls (*p* = 0.004) (Figure S1). Under LD following LL, *Bmal1*^{+/+} mice showed higher spontaneous locomotor activity during the dark phase than during the light phase in both the control (*p* = 0.0001) and the RH group (*p* = 0.0001). Additionally, the *Bmal1*^{−/−} control mice (*n* = 9: 4 female and 5 male) showed higher spontaneous locomotor activity during the dark phase than during the light phase (*p* = 0.03). In contrast, *Bmal1*^{−/−} mice with an RH (*n* = 8: 3 female and 5 male) showed a tendency to be more active during the dark phase than during the light phase, but this difference was not statistically significant (*p* = 0.08) (Figure 1A,C). Moreover, the total activity count was comparable between the *Bmal1*^{+/+} control and *Bmal1*^{+/+} with an RH (*p* = 0.4). However, *Bmal1*^{−/−} mice with an RH showed a significant decrease in total activity as compared with *Bmal1*^{−/−} control mice (*p* = 0.02). In both LL and LD, there were no significant differences in spontaneous locomotor activity between males and females of both genotypes (*p* > 0.05).

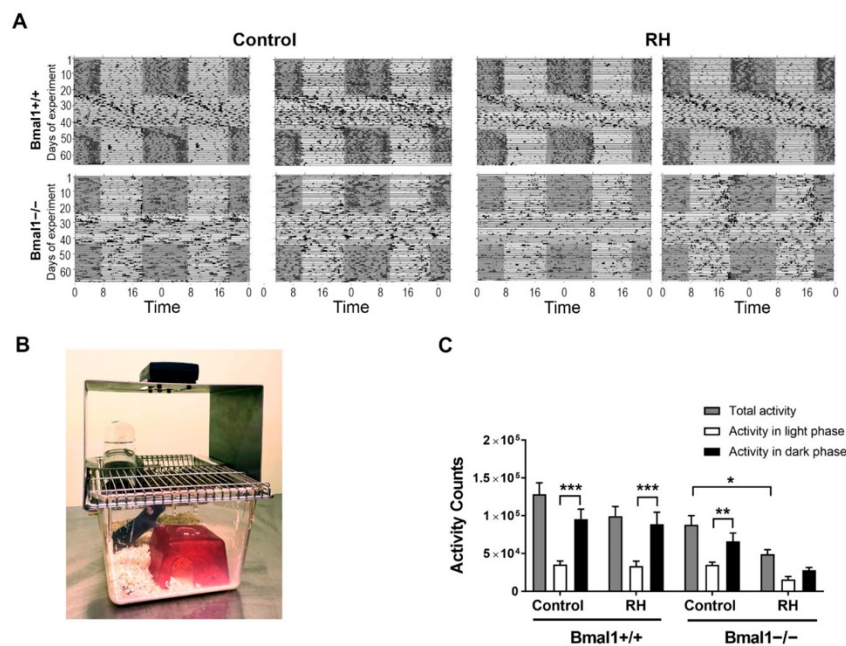


Figure 1. (A) Representative double plotted actograms of spontaneous locomotor activity of Bmal1^{+/+} and Bmal1^{-/-} mice kept without (control, left panel) or with a red house (RH, right panel) under a 12-h light/12-h dark cycle (LD), followed by a constant light cycle (LL) and a second LD. Black bars represent activity. Grey boxes indicate periods of darkness. (B) Representative picture showing the red house and on-cage activity monitoring. (C) Mean total activity counts (grey bars), during the light phase in control (white bars) and the corresponding dark phases (black bars), under the second LD. Values are shown as mean + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Groups were compared using the Mann-Whitney U-test (Bmal1^{+/+}: $n = 12$ control, $n = 11$ with RH; Bmal1^{-/-}: $n = 8$ per group).

2.2. Expression of mPER1 and p-ERK in SCN Is Affected by RH

The number of mPER1+ cells in the SCN was higher at ZT14 as compared to ZT02 in all subgroups ($n = 6$ –7 mice in each subgroup). There was no significant difference in the number of mPER1+ cells between Bmal1^{+/+} mice with and without RH at ZT02 or at ZT14 ($n = 6$ mice: 3 female and 3 male mice for each condition at each time point). However, the number of mPER1+ cells at ZT14 was significantly lower in the Bmal1^{-/-} controls ($n = 7$ mice: 4 females and 3 males) as compared to the Bmal1^{+/+} control mice ($p = 0.001$). The number of mPER1+ cells at ZT14 in the SCN of Bmal1^{-/-} mice was significantly lower in the RH group ($n = 6$ mice: 4 females and 2 males) than in the respective control group ($p = 0.04$) or Bmal1^{+/+} with an RH group ($p = 0.02$) (Figure 2A,C).

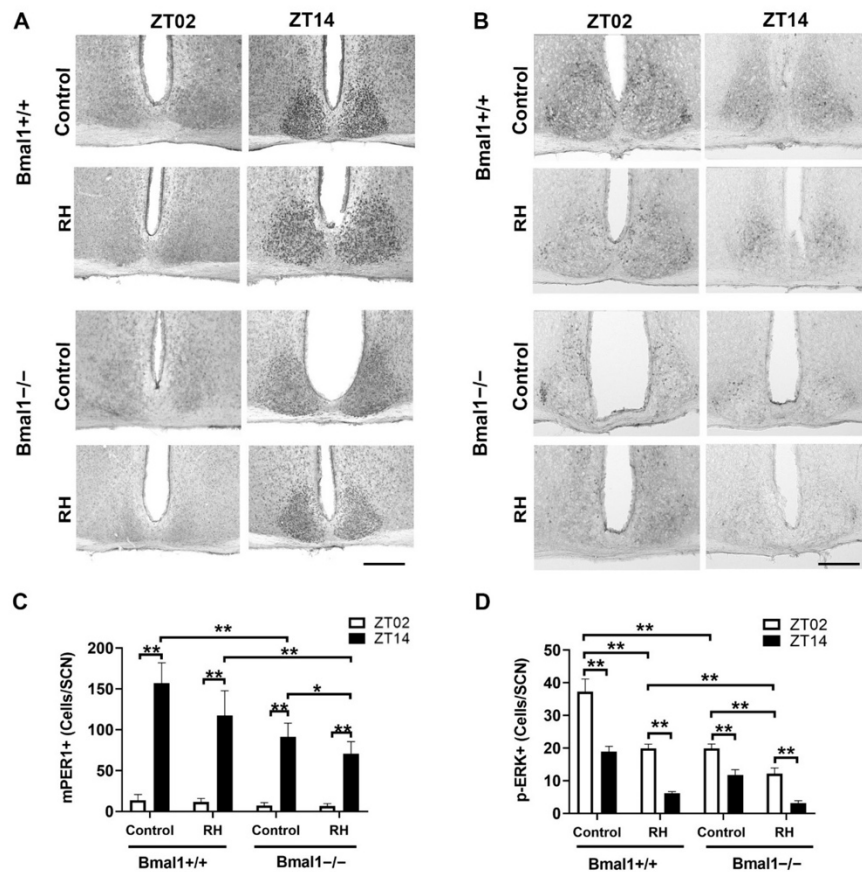


Figure 2. (A) Representative mPER1-immunoreactive (+) cells in the SCN of Bmal1^{+/+} and Bmal1^{-/-} mice perfused at ZT02 or ZT14 without (control) and with RH. Scale bar = 100 μ m. (B) Representative p-ERK-immunoreactive (+) cells in the SCN of Bmal1^{+/+} and Bmal1^{-/-} mice without (control) or with RH, perfused at ZT02 or ZT14. Scale bar = 100 μ m. (C) Quantification of mPER1+ cells in the SCN of the different subgroups. (D) Quantification of p-ERK+ cells in the SCN. ZT02 (white bars), ZT14 (black bars). Values are shown as mean + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Groups were compared using the Mann-Whitney U-test ($n = 6$ per subgroup).

The number of p-ERK+ cells in the SCN was higher at ZT02 as compared to ZT14 in all subgroups ($n = 6$ –7 mice in each subgroup). In the Bmal1^{+/+} control group, the number of p-ERK+ cells was higher than in the Bmal1^{+/+} RH group at both ZT02 and ZT14 ($n = 6$ mice: 3 female and 3 male mice for each condition at each time point) ($p = 0.002$). In the Bmal1^{-/-} control group (ZT02: $n = 6$ mice: 4 females and 2 males; ZT14: $n = 7$ mice: 4 females and 3 males), the number of p-ERK+ cells was lower than in the Bmal1^{+/+} control group ($n = 6$ mice: 3 female and 3 male mice at each time point) at both ZT02 ($p = 0.002$) and ZT14 ($p = 0.001$). In the Bmal1^{-/-} RH group (ZT02: $n = 6$ mice: 4 females and 2 males; ZT14: $n = 6$ mice: 3 females and 3 males), the number of p-ERK+ cells was lower

as compared to the Bmal1^{−/−} control group at ZT02 ($p = 0.002$) and at ZT14 ($p = 0.0006$), and also compared to the respective Bmal1^{+/+} groups ($p < 0.01$) (Figure 2B,D).

2.3. Plasma Corticosterone Level Is Not Affected by RH

The plasma corticosterone level was higher at ZT14 as compared to ZT02 in all subgroups ($n = 5$ per subgroup) (Table 1). There were no significant differences among the subgroups either at ZT02 ($p = 0.3$) or at ZT14 ($p = 0.9$).

Table 1. Plasma corticosterone level (ng/mL) during the early inactive phase (ZT02) and early active phase (ZT14). The p value indicates differences between ZT02 and ZT14 in each subgroup.

	Bmal1 ^{+/+} Control	Bmal1 ^{+/+} RH	Bmal1 ^{−/−} Control	Bmal1 ^{−/−} RH
ZT02	2.8 ± 0.9	2.7 ± 0.5	1.9 ± 0.4	1.6 ± 0.2
ZT14	7.1 ± 0.1	6.9 ± 0.9	6.6 ± 1.4	7.6 ± 0.7
p -value	0.03	0.008	0.02	0.008

3. Discussion

The RH is appreciated by nocturnal laboratory rodents as a dark hiding place during the inactive/light phase, and by animal attendants as it allows visual control of the animals without disturbance [46]. Our study shows that this trade-off works well in wildtype mice with an intact light input into the circadian system and an intact molecular clockwork. However, in Bmal1^{−/−} mice, which have a corrupted light input into the circadian system and a disturbed molecular clockwork, the RH has a detrimental effect on the synchronization of rhythmic spontaneous locomotor activity to the standard laboratory light/dark conditions. Thus, for studies on time-of-day-dependent behavior and brain/body functions in mice with impacted visual and/or clockwork function, the use of the RH should be considered carefully.

As expected for nocturnal animals, Bmal1^{+/+} mice show higher locomotor activity during the dark phase as compared to the light phase. Similarly, and in agreement with our previous observations [39], locomotor activity was higher during the dark phase in Bmal1-deficient controls despite a compromised light input into the circadian system and a disrupted circadian clock [37,40,41,48]. This rhythm is due to the suppression of activity by light, an effect called negative masking, rather than entrainment, which requires an intact clockwork. The use of an RH did not affect rhythmic spontaneous locomotor activity in Bmal1^{+/+} mice; thus, the RH is applicable for studies on time-of-day-dependent rhythms in wildtype mice. In contrast, the use of the RH in Bmal1^{−/−} mice had a detrimental effect on masking. This is surprising, as the RH filters out the short-wavelength light that is known to have the largest melanopsin-dependent effects on the circadian system. However, the circadian system also receives cone-based chromatic signals [49]. Especially under low-irradiance conditions, longer-wavelength light (L-opsin activation) has a stronger impact on the entrainment of circadian rhythms than shorter-wavelength light (S-opsin activation), while providing identical melanopsin and rod activation [35]. Importantly, negative masking depends on both melanopsin [50] and the classical photoreceptors [51]. Tissue-specific lesions of Bmal1 on the retina affect visual information processing in both the rod and cone pathways [14,41] and reduce the viability of cones, especially in older mice [14]. Thus, for this study, we used mice at the age of 30 weeks, at which age Bmal1^{−/−} mice show symptoms of premature aging [38]. Thus, we conclude that Bmal1^{−/−} are not able to detect the red light at low irradiance, and will interpret the light conditions in an RH as “darkness”, but will be able to detect the light in the home cage with their remaining photoreceptors. We assume that both Bmal1^{−/−} subgroups awoke at a random time, as the circadian rhythm generator was disrupted and, consequently, they were not able to anticipate the dark phase. However, the Bmal1^{−/−} mice sleeping in an RH are faced with “darkness” upon waking and will leave the RH. Outside the RH, they are faced with either light or darkness. If faced with “light”, they are confused by the contradicting

information and might return to the RH. If faced with “dark”, they stay awake until the lights are turned on. In contrast, the *Bmal1*^{−/−} control mice are faced with “light” upon waking during the light phase, which immediately inhibits activity, or with “dark” upon waking during the dark phase. Thus, the higher activity of the *Bmal1*^{−/−} control group, particularly during the dark phase, is a result of benefiting more efficiently from the “light” and “dark” information.

In the SCN of *Bmal1*^{+/+} mice, mPER1-Ir was high during the early dark phase (ZT14) and low at the early light phase (ZT02), as expected [52,53]. This difference was not affected in *Bmal1*^{+/+} RH or *Bmal1*^{−/−} control mice, consistent with rhythmic behavior. The differences in PER1 expression in *Bmal1*^{−/−} control mice are consistent with our earlier observations that *Bmal1* is dispensable for light-induced mPER1 expression. However, the amplitude of mPER1-Ir at ZT14 in *Bmal1*^{−/−} control mice was reduced as compared to *Bmal1*^{+/+} control mice, presumably because, here, the rhythmic expression is driven by light only, and not additionally by the molecular clockwork. Surprisingly, in *Bmal1*^{−/−} RH mice, mPER1-Ir was high at ZT14 and low at ZT02. This is unexpected, as *Bmal1*^{−/−} RH mice did not show rhythmic locomotor activity. This suggests that the light which the mice received during the light phase outside the RH is sufficient to drive rhythmic mPER1 expression in the SCN. To further prove this hypothesis, we analyzed p-ERK in the SCN, which is strongly activated by light and plays an important role in the activation of CRE/CREB-mediated transcription [23,54,55]. Indeed, p-ERK-Ir was higher at ZT02 as compared to ZT14 in all four subgroups. Interestingly, the amplitude of p-ERK-Ir in *Bmal1*^{+/+} RH mice at ZT02 was lower as compared to *Bmal1*^{+/+} control mice, and similar to that in *Bmal1*^{−/−} control mice. In *Bmal1*^{−/−} mice with an RH, the amplitude of p-ERK-Ir at ZT02 was even lower. This suggests that the number of p-ERK+ SCN cells is correlated with the strength of the light input. Moreover, the data indicate that the light that the *Bmal1*^{−/−} mice receive during the light phase outside the RH is sufficient to induce p-ERK expression in the SCN, independent of rhythmic activity. Moreover, plasma corticosterone levels were higher at ZT14 as compared to ZT02 in all four subgroups. This is consistent with the observations of Sollas et al. [56], showing that both the light/dark cycle and the activity rhythm contribute to rhythmic corticosterone levels, and that the rhythm of clock gene expression in the SCN is aligned with the rhythm of clock expression in the adrenal cortex. In addition, there was no difference in corticosterone levels at ZT02 or ZT14 among all subgroups, indicating that mice without an RH do not suffer from higher stress levels.

Taken together, under standard laboratory light/dark conditions, the application of the RH in *Bmal1*^{−/−} mice, which have both circadian dysfunction and light-input impairment, affects rhythmic spontaneous locomotor activity and dampens the rhythmic expression of mPER1 and p-ERK in the SCN. On the other hand, mice with and without the RH have similar glucocorticoid levels, suggesting little impact on chronic stress. Thus, for studies using mice with a corrupted circadian system, we recommend not using the RH. Moreover, this study shows that the rhythmic expression of mPER1 and p-ERK in the SCN is less prone to impairment of retinal function and independent of rhythmic activity.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Adult male (*n* = 22) and female (*n* = 27) *Bmal1*^{−/−} and wildtype (*Bmal1*^{+/+}) littermates obtained by breeding of male and female *Bmal1*^{+/-} (generously provided by Christopher Bradfield [37]) were kept individually in standardized type 2 short cages in temperature- and light-controlled (250–300 lux) cabinets (ScanClim^{BASIC}, Scanbur, Denmark, light bulb: Osram 6428 12V 3W SV7, Osram, Germany) and were fed ad libitum. All animal experiments were conducted in accordance with international guidelines for the ethical use of experimental animals.

4.2. Behavioral Analysis

The mice were randomly divided into two groups. One group was kept without the RH (control), and one with the RH (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Germany; Figure 1B). All mice were checked daily at different times during the light phase, without disturbing them, to ensure that the RH mice used the RH to sleep in. The mice were kept under a standard 12-h light/12-h dark (LD, lights on at 06:00 am and lights off at 06:00 pm) cycle for 3 weeks.

The light intensity under the RH was 35 lux, as determined using a luxmeter, and the light wavelength was >600 nm, as determined using a Varian Cary® 50 UV-Vis Spectrophotometer. During the dark phase, the light intensity was 0 lux either with or without the RH. This was followed by a period of constant light (LL) for 3 weeks, and a second LD cycle for an additional 3 weeks. LL was used for desynchronization of SCN clock cells [57,58] to better evaluate the potential of the ambient light conditions to re-synchronize the respective rhythms. Spontaneous locomotor activity was continuously recorded using on-cage infrared detectors (Mouse-E-Motion, Hamburg, Germany) and was analyzed using Clocklab software (Actimetrics, Wilmette, IL, USA).

4.3. Tissue Processing

After the second LD, each group was divided into two subgroups that were sacrificed 2 h after lights on (ZT02) or 2 h after lights off (ZT14) using an overdose of ketamin/xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively). The mice were perfused transcardially with 0.09% NaCl and then with 4% formaldehyde using a Ministar Peristaltic Pump (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA); then, brains were removed from the skull, underwent post-fixation for an additional 24 h, and were cryoprotected in 30% sucrose until sinking. The brains were sectioned through the whole rostro-caudal extent of the SCN using a cryostat (Leica CM, Wetzlar, Germany), to obtain a series of 30-µm-thick free-floating coronal sections. The sections were kept at −20 °C until further processing.

4.4. Immunohistochemistry

The sections were rinsed in PBS, then incubated in 5% normal goat serum in PBS-T 0.2% for one hour at RT to block the nonspecific binding of secondary antibody, followed by incubation with markers for rhythmic SCN neuronal activity rabbit monoclonal anti phosphorylated ERK1/2 (p-ERK) (1:1000, #4695, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and rabbit polyclonal mPER1 (1:3000, #P3342-11, US Biologicals, USA), as described previously [59]. The sections were incubated with the VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (Vectorlabs, Burlingame, CA, USA) for one hour at RT, then rinsed and incubated with 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 5 min. Finally, the sections were cover-slipped using entelan.

4.5. Image Analysis

All images were acquired with bright field microscopy (BZ-9000E, Keyence, Japan) using identical settings. All images were equally subjected to image processing, including haze reduction for contrast enhancement. The number of p-ERK- and mPER1-immunoreactive (+) cells within the unilateral SCN was counted in a blinded manner using Image J software. For each mouse, the average number of p-ERK+ or mPER1+ cells per SCN was calculated from three sections of the respective series.

4.6. Plasma Corticosterone Analysis

Blood was collected from the right atrium in EDTA tubes and centrifuged. Plasma corticosterone levels were analyzed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ab108821, Abcam), according to the manufacturer's instructions.

4.7. Statistics

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software. The Mann-Whitney U-test was used to determine differences between two groups, and the Kruskal-Wallis test to compare multiple groups. A p value < 0.05 was considered statistically significant. Values were presented as the mean $\pm$ SEM.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2288/s1>, Figure S1: (A) Quantitative analysis of total spontaneous locomotor activity counts during constant light (LL). **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. The power of the 24 h phase was analyzed by fast Fourier transformation (FFT) in (B) Bmal1+/+ and (C) Bmal1−/− without (black) and with (red) RH during the first 10 days after transition to LL.

Author Contributions: Conceptualization, M.I., M.S. and C.v.G.; Data curation, M.Ö., A.A.H.A. and C.v.G.; Formal analysis, M.Ö., A.A.H.A. and C.v.G.; Methodology, M.Ö., M.I. and A.A.H.A.; Project administration, C.v.G.; Supervision, C.v.G.; Visualization, M.Ö., A.A.H.A. and C.v.G.; Writing—original draft, M.Ö., A.A.H.A. and C.v.G.; Writing—review and editing, M.Ö., M.I., M.S., A.A.H.A. and C.v.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The publication of this work is supported by Heinrich Heine University.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of North Rhine-Westphalia State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection, Germany (protocol code: 84.02.04.2012 A102 date of approval: 04.06.2012).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Hanna Bellert, Ralf Fassbender, Angelika Hallenberger and Ursula Lammersen for their excellent technical support. We are much obliged to the Central Institute for Animal Research and Animal Protection (ZETT), Heinrich Heine-Universität, Düsseldorf, Germany. We thank Götz Lehmann for measuring the wavelength beneath the RH. We also thank Christopher Bradfield for providing Bmal1+/- breeding pairs.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Balsalobre, A. Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science* **2000**, *289*, 2344–2347. [CrossRef]
- Engeland, W.C.; Massman, L.; Miller, L.; Leng, S.; Pignatti, E.; Pantano, L.; Carlone, D.L.; Kofuji, P.; Breault, D.T. Sex Differences in Adrenal Bmal1 Deletion-Induced Augmentation of Glucocorticoid Responses to Stress and ACTH in Mice. *Endocrinology* **2019**, *160*, 2215–2229. [CrossRef]
- Dumbell, R.; Leliavski, A.; Matveeva, O.; Blaum, C.; Tsang, A.H.; Oster, H. Dissociation of Molecular and Endocrine Circadian Rhythms in Male Mice Lacking Bmal1 in the Adrenal Cortex. *Endocrinology* **2016**, *157*, 4222–4233. [CrossRef]
- Gong, S.; Miao, Y.-L.; Jiao, G.-Z.; Sun, M.-J.; Li, H.; Lin, J.; Luo, M.-J.; Tan, J.-H. Dynamics and Correlation of Serum Cortisol and Corticosterone under Different Physiological or Stressful Conditions in Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117503. [CrossRef] [PubMed]
- Ralph, C.R.; Tilbrook, A.J. INVITED REVIEW: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *J. Anim. Sci.* **2016**, *94*, 457–470. [CrossRef] [PubMed]
- Reppert, S.M.; Weaver, D.R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **2002**, *418*, 935–941. [CrossRef] [PubMed]
- Gekakis, N.; Staknis, D.; Nguyen, H.B.; Davis, F.C.; Wilsbacher, L.D.; King, D.P.; Takahashi, J.S.; Weitz, C.J. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **1998**, *280*, 1564–1569. [CrossRef]
- Hogenesch, J.B.; Gu, Y.-Z.; Jain, S.; Bradfield, C.A. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 5474–5479. [CrossRef]
- Jin, X.; Shearman, L.P.; Weaver, D.R.; Zylka, M.J.; De Vries, G.J.; Reppert, S.M. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **1999**, *96*, 57–68. [CrossRef]
- Kume, K.; Zylka, M.J.; Sriram, S.; Shearman, L.P.; Weaver, D.R.; Jin, X.; Maywood, E.S.; Hastings, M.H.; Reppert, S.M. mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell* **1999**, *98*, 193–205. [CrossRef]
- Lee, C.; Etchegaray, J.-P.; Cagampang, F.R.A.; Loudon, A.S.I.; Reppert, S.M. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **2001**, *107*, 855–867. [CrossRef]
- Tosini, G.; Menaker, M. Circadian Rhythms in Cultured Mammalian Retina. *Science* **1996**, *272*, 419–421. [CrossRef]
- Tosini, G.; Pozdeyev, N.; Sakamoto, K.; Iuvone, P.M. The circadian clock system in the mammalian retina. *BioEssays* **2008**, *30*, 624–633. [CrossRef] [PubMed]

14. Baba, K.; Piano, I.; Lyuboslavsky, P.; Chrenek, M.A.; Sellers, J.T.; Zhang, S.; Gargini, C.; He, L.; Tosini, G.; Iuvone, P.M. Removal of clock gene Bmal1 from the retina affects retinal development and accelerates cone photoreceptor degeneration during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 13099–13104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Baba, K.; Ribelayga, C.P.; Iuvone, P.M.; Tosini, G. The Retinal Circadian Clock and Photoreceptor Viability. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1074*, 345–350. [\[CrossRef\]](#)
16. McMahon, D.G.; Iuvone, P.M.; Tosini, G. Circadian organization of the mammalian retina: From gene regulation to physiology and diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* **2014**, *39*, 58–76. [\[CrossRef\]](#)
17. Aschoff, J.; Hoffmann, K.; Pohl, H.; Wever, R. Re-entrainment of circadian rhythms after phase-shifts of the Zeitgeber. *Chronobiologia* **1975**, *2*, 23–78.
18. Chen, D.; Buchanan, G.F.; Ding, J.M.; Hannibal, J.; Gillette, M.U. Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: A pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13468–13473. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Hannibal, J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res.* **2002**, *309*, 73–88. [\[CrossRef\]](#)
20. Ginty, D.; Kornhauser, J.; Thompson, M.; Bading, H.; Mayo, K.; Takahashi, J.; Greenberg, M. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* **1993**, *260*, 238–241. [\[CrossRef\]](#)
21. Ding, J.M.; Faiman, L.E.; Hurst, W.J.; Kuriashkina, L.R.; Gillette, M.U. Resetting the Biological Clock: Mediation of Nocturnal CREB Phosphorylation via Light, Glutamate, and Nitric Oxide. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 667–675. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Gau, D.; Lemberger, T.; Von Gall, C.; Kretz, O.; Le Minh, N.; Gass, P.; Schmid, W.; Schibler, U.; Korf, H.W.; Schütz, G. Phosphorylation of CREB Ser142 Regulates Light-Induced Phase Shifts of the Circadian Clock. *Neuron* **2002**, *34*, 245–253. [\[CrossRef\]](#)
23. Coogan, A.N.; Piggins, H.D. Circadian and photic regulation of phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 3085–3093. [\[CrossRef\]](#)
24. Reppert, S.M.; Weaver, D.R. Molecular Analysis of Mammalian Circadian Rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* **2001**, *63*, 647–676. [\[CrossRef\]](#)
25. Shuboni, D.; Cramm, S.; Yan, L.; Nunez, A.; Smale, L. Acute Behavioral Responses to Light and Darkness in Nocturnal Mus musculus and Diurnal Arvicantis niloticus. *J. Biol. Rhythm.* **2012**, *27*, 299–307. [\[CrossRef\]](#)
26. Aschoff, J. Masking and Parametric Effects of High-Frequency Light-Dark Cycles. *Jpn. J. Physiol.* **1999**, *49*, 11–18. [\[CrossRef\]](#)
27. Phillips, A.J.K.; Fulcher, B.D.; Robinson, P.A.; Klerman, E.B. Mammalian Rest/Activity Patterns Explained by Physiologically Based Modeling. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1003213. [\[CrossRef\]](#)
28. DeCoursey, P.J. Light-sampling behavior in photoentrainment of a rodent circadian rhythm. *J. Comp. Physiol. A* **1986**, *159*, 161–169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Berson, D.M.; Dunn, F.A.; Takao, M. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science* **2002**, *295*, 1070–1073. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Hattar, S.; Liao, H.-W.; Takao, M.; Berson, D.M.; Yau, K.-W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* **2002**, *295*, 1065–1070. [\[CrossRef\]](#)
31. Lucas, R.J.; Douglas, R.H.; Foster, R.G. Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 621–626. [\[CrossRef\]](#)
32. Lall, G.S.; Revell, V.L.; Momiji, H.; Al Enezi, J.; Altimus, C.M.; Güler, A.D.; Aguilar, C.; Cameron, M.A.; Allender, S.; Hankins, M.W.; et al. Distinct Contributions of Rod, Cone, and Melanopsin Photoreceptors to Encoding Irradiance. *Neuron* **2010**, *66*, 417–428. [\[CrossRef\]](#)
33. Bailes, H.J.; Lucas, R.J. Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light ($\lambda_{\max} \approx 479$ nm) supporting activation of G_q/11 and G_{i/o} signalling cascades. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2013**, *280*, 20122987. [\[CrossRef\]](#)
34. Gooley, J.J.; Rajaratnam, S.M.W.; Brainard, G.C.; Kronauer, R.E.; Czeisler, C.A.; Lockley, S.W. Spectral Responses of the Human Circadian System Depend on the Irradiance and Duration of Exposure to Light. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2*, 31ra33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Moulard, J.W.; Martial, F.; Watson, A.; Lucas, R.J.; Brown, T.M. Cones Support Alignment to an Inconsistent World by Suppressing Mouse Circadian Responses to the Blue Colors Associated with Twilight. *Curr. Biol.* **2019**, *29*, 4260–4267.e4. [\[CrossRef\]](#)
36. Spitschan, M.; Lucas, R.J.; Brown, T.M. Chromatic clocks: Color opponency in non-image-forming visual function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2017**, *78*, 24–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Bunger, M.K.; Wilsbacher, L.D.; Moran, S.M.; Clendenen, C.; Radcliffe, L.A.; Hogenesch, J.B.; Simon, M.C.; Takahashi, J.S.; Bradfield, C.A. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **2020**, *103*, 1009–1017. [\[CrossRef\]](#)
38. Kondratov, R.V.; Kondratova, A.A.; Gorbacheva, V.Y.; Vykhovanets, O.V.; Antoch, M.P. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1868–1873. [\[CrossRef\]](#)
39. Pfeffer, M.; Korf, H.-W.; Von Gall, C. Chronotype and stability of spontaneous locomotor activity rhythm in BMAL1-deficient mice. *Chronobiol. Int.* **2014**, *32*, 81–91. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Pfeffer, M.; Müller, C.M.; Mordel, J.; Meissl, H.; Ansari, N.; Deller, T.; Korf, H.-W.; Von Gall, C. The Mammalian Molecular Clockwork Controls Rhythmic Expression of Its Own Input Pathway Components. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 6114–6123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

41. Storch, K.-F.; Paz, C.; Signorovitch, J.; Raviola, E.; Pawlyk, B.; Li, T.; Weitz, C.J. Intrinsic Circadian Clock of the Mammalian Retina: Importance for Retinal Processing of Visual Information. *Cell* **2007**, *130*, 730–741. [\[CrossRef\]](#)
42. Langgartner, D.; Foertsch, S.; Fuchsl, A.M.; Reber, S.O. Light and water are not simple conditions: Fine tuning of animal housing in male C57BL/6 mice. *Stress* **2016**, *20*, 27–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Scariot, P.P.M.; Manchado-Gobatto, F.B.; Prolla, T.A.; Dos Reis, I.G.M.; Gobatto, C.A. Housing conditions modulate spontaneous physical activity, feeding behavior, aerobic running capacity and adiposity in C57BL/6J mice. *Horm. Behav.* **2019**, *115*, 104556. [\[CrossRef\]](#)
44. Wolfer, D.P.; Litvin, O.; Morf, S.; Nitsch, R.M.; Lipp, H.-P.; Würbel, H.; Wuerbel, H. Cage enrichment and mouse behaviour. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *432*, 821–822. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Bayne, K. Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives. *Anim. Model. Exp. Med.* **2018**, *1*, 82–90. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Wirz, A.; Mandillo, S.; D'Amato, F.R.; Giuliani, A.; Riviello, M.C. Response, use and habituation to a mouse house in C57BL/6J and BALB/c mice. *Exp. Anim.* **2015**, *64*, 281–293. [\[CrossRef\]](#)
47. André, V.; Gau, C.; Scheidele, A.; Aguilar-Pimentel, J.A.; Amarie, O.V.; Becker, L.; Garrett, L.; Hans, W.; Höfler, S.M.; Janik, D.; et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. *PLoS Biol.* **2018**, *16*, e2005019. [\[CrossRef\]](#)
48. Storch, K.-F.; Paz, C.; Signorovitch, J.; Raviola, E.; Pawlyk, B.; Li, T.; Weitz, C.J. Physiological Importance of a Circadian Clock Outside the Suprachiasmatic Nucleus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2007**, *72*, 307–318. [\[CrossRef\]](#)
49. Walmsley, L.; Hanna, L.; Moulard, J.; Martial, F.; West, A.; Smedley, A.R.; Bechtold, D.A.; Webb, A.R.; Lucas, R.J.; Brown, T.M. Colour As a Signal for Entraining the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biol.* **2015**, *13*, e1002127. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Mrosovsky, P.N.; Hattar, S. Impaired Masking Responses to Light in Melanopsin-Knockout Mice. *Chronobiol. Int.* **2003**, *20*, 989–999. [\[CrossRef\]](#)
51. Mrosovsky, N.; Thompson, S. Negative and positive masking responses to light in retinal degenerate slow (rds/rds) mice during aging. *Vis. Res.* **2008**, *48*, 1270–1273. [\[CrossRef\]](#)
52. Hannibal, J.; Norn, T.H.B.; Georg, B.; Fahrenkrug, J. Spatiotemporal expression pattern of PERIOD 1 and PERIOD 2 in the mouse SCN is dependent on VIP receptor 2 signaling. *Eur. J. Neurosci.* **2019**, *50*, 3115–3132. [\[CrossRef\]](#)
53. Hastings, M.H.; Field, M.D.; Maywood, E.S.; Weaver, D.R.; Reppert, S.M. Differential Regulation of mPER1 and mTIM Proteins in the Mouse Suprachiasmatic Nuclei: New Insights into a Core Clock Mechanism. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, RC11. [\[CrossRef\]](#)
54. Smith, V.M.; Jeffers, R.T.; Wu, C.; Shankara, J.V.; Antle, M.C. Temporal changes of light-induced proteins in the SCN following treatment with the serotonin mixed agonist/antagonist BMY7378. *Exp. Brain Res.* **2015**, *233*, 2723–2731. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Goldsmith, C.S.; Bell-Pedersen, D. Diverse Roles for MAPK Signaling in Circadian Clocks. *Adv. Genet.* **2013**, *84*, 1–39. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Sollars, P.J.; Weiser, M.J.; Kudwa, A.E.; Bramley, J.R.; Ogilvie, M.D.; Spencer, R.L.; Handa, R.J.; Pickard, G.E. Altered Entrainment to the Day/Night Cycle Attenuates the Daily Rise in Circulating Corticosterone in the Mouse. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111944. [\[CrossRef\]](#)
57. Chen, R.; Seo, N.-O.; Bell, E.; Von Gall, C.; Lee, C. Strong Resetting of the Mammalian Clock by Constant Light Followed by Constant Darkness. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 11839–11847. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Ohta, H.; Yamazaki, S.; McMahon, D.G. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 267–269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Ingenwerth, M.; Reinbeck, A.L.; Stahr, A.; Partke, H.-J.; Roden, M.; Burkart, V.; Von Gall, C. Perturbation of the molecular clockwork in the SCN of non-obese diabetic mice prior to diabetes onset. *Chronobiol. Int.* **2016**, *33*, 1369–1375. [\[CrossRef\]](#)

3 Diskussion

3.1 Das rote Haus als Enrichment-Maßnahme

Der Lebensbereich von Nagetieren wie Mäuse und Ratten in Laborhaltungen gestaltet sich aus einer Vielzahl von einzuschließenden Faktoren. Betriebswirtschaftliche Gegebenheiten, wie eine praktikable Nutzung von Laborräumen, der Verfügbarkeit von Personal und Material und den damit verbundenen Kosten, gilt es zu berücksichtigen [167]. Gleichweise sind präzise Hygienestandards zu gewährleisten. Eine ergonomische Gestaltung wie die Möglichkeit einer schnellen Sichtbarkeit der Tiere und einer unkomplizierten Reinigung der Käfige fließt ebenfalls in die Organisation von Tierhaltungen ein [167]. Dies führte über Jahre hinweg zu einer Etablierung reizarmer Lebensräume, die den Tieren wenig Möglichkeit zur Annäherung an ihr natürliches Verhalten boten [167]. Karge, unterfordernde Lebensräume in wissenschaftlichen Haltungen gehen mit Stress und pathophysiologischen Veränderungen einher [168].

Demgegenüber stehen die ethologischen Anforderungen der jeweiligen Spezies, die nebst rechtlichen Vorgaben (s. a. Kapitel 1.5.2) auch aus einem Anspruch ethischer Verantwortung heraus zu erfüllen sind. In diesem Zusammenhang entwickelte sich in den vergangenen 40 Jahren ein großes Interesse auf dem multidisziplinären Gebiet der *animal welfare science*, der „Wohlbefindensforschung“ von Tieren [169]. Es kam zu Bemühungen, den Begriff „Wohlbefinden“ von Labortieren zu definieren. In diesem Zuge ergaben Studien, wie bereits in der Einleitung dargestellt, neue Erkenntnisse über die Gesundheit von Tieren in Haltung. Immer mehr Untersuchungen beschäftigten sich mit der Ausgestaltung der Lebensräume von Labortieren, auch wurden Auswirkungen von Enrichment aufgearbeitet [170].

Insbesondere wurde der Frage nachgegangen, inwiefern eine anregende, vielseitige Umwelt auf die Physiologie von Labortieren einwirken kann. So zeigte sich beispielsweise, dass Enrichment bei Mäusen Angstgefühle verringern kann und der Stressbewältigung nützt [171]. Gleichmaßen wurde der Einfluss der Haltungsumwelt im Hinblick auf die Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson analysiert [172]. Daneben be-

stehen aufschlussreiche Ergebnisse aus der Immunoonkologie, bei der beispielsweise Mäuse mit B-Zell-Lymphomen unter Enrichment ein signifikant besseres Ansprechen auf Immuntherapien boten, als erkrankte Tiere ohne Enrichment [173]. Immunoprotektive Effekte durch Enrichment werden ebenfalls diskutiert [174].

Demgemäß bestehen verschiedene gesetzliche Richtlinien und Empfehlungen für die Tierhaltung im wissenschaftlichen Kontext, um die Gesundheit und das Wohlbefinden der Tiere zu fördern. Diese Maßstäbe schlossen nach und nach den Einsatz von Enrichment in der Tierforschung ein, da Studien den Nutzen (s. o.) der Maßnahmen darlegen konnten. Inzwischen gibt es eine Vielzahl an Unternehmen, die sich auf die Herstellung von *Cage Enrichment* fokussieren. Das RH besitzt einen besonderen Stellenwert in der Verbesserung der Haltungsbedingungen von Labortieren. Es wurde gezielt für Mäuse konzipiert, um ihnen einen dunklen Rückzugsort bereitzustellen, da sie das rote, langwellige Licht nicht wahrnehmen (s. a. Kapitel 1.3). Das RH ist, wie in der Einleitung beschrieben, wiederverwendbar, zweckmäßig, leicht zu reinigen und für das Personal anwenderfreundlich, da Beobachtungen durch das klare Plastik vereinfacht und die Tiere hierbei nicht gestört werden.

3.2 Einfluss des RH auf die spontane lokomotorische Aktivität

In Lichtphasen, in denen nachtaktive Säuger wie die in unserer Arbeit analysierten Mäuse inaktiv sind, dient das RH als dunkler bevorzugter Rückzugsort und Schlafplatz. Licht kürzerer Wellenlänge wird durch das Polycarbonat herausgefiltert, während das rote langwellige Licht hindurchdringen kann. Die Aktogramme (vgl. Abb. 1A aus Publikation), die durch kontinuierliche Aufzeichnung über Infrarot-Detektoren erstellt werden konnten, erlaubten eine übersichtliche Auswertung der spontanen lokomotorischen Aktivität im Beobachtungszeitraum.

Wildtyp-Mäuse zeigen gemäß ihrer Natur als nachtaktive Säugetiere eine höhere lokomotorische Aktivität unter Dunkelphasen als unter Licht. Bei *Bmal1*^{+/+} Mäusen mit einem stabilen molekularen Uhrwerk und einer intakten Lichtperzeption kommt es durch das RH zu keiner Beeinträchtigung der rhythmischen

spontanen lokomotorischen Aktivität. Sie sind, wie vorherzusehen, während der Dunkelperioden aktiver als während der Lichtzeit.

Aufgrund früherer Beobachtungen [132] haben wir bereits erwartet, dass auch *Bmal1*^{-/-} Tiere eine höhere lokomotorische Aktivität in der Dunkel- als in der Lichtphase aufweisen, trotz defekten Lichteingangs und gestörter zentraler zirkadianer Uhr [135, 175-177]. Dies ist keine Folge von Entrainment, sondern von negativem Masking, da Entrainment einen intakten zirkadianen Oszillator per definitionem voraussetzt. Masking hingegen erfordert keinen endogenen Rhythmusgenerator (s. a. Kapitel 1.4.1). Licht wirkt als solches hemmend auf die Aktivität der Tiere.

Allerdings zeigt unsere Studie, dass es sich bei *Bmal1*^{-/-} Mäusen mit Hinzunahme des RH anders verhält. Erstaunlicherweise beeinträchtigt hier das RH den beschriebenen Effekt von Masking. Licht kurzer Wellenlänge (479 nm) aktiviert insbesondere Melanopsin-abhängige Signalkaskaden im zirkadianen System [80, 92]. Das RH filtert das Licht genau aus diesem Wellenlängenbereich heraus. Auch erfüllt das Melanopsin grundlegende Aufgaben bei der Aufrechterhaltung von Masking über längere Zeitintervalle [178]. Negatives Masking, also die Suppression spontaner lokomotorischer Aktivität durch Licht, erfordert allerdings nicht nur Melanopsin in ipRGCs [178], sondern auch die bekannten Photorezeptoren, die Zapfen und die Stäbchen [179]. Mäuse mit gewebespezifischer, retinaler *Bmal1*-Depletion zeigen in den Signalwegen der Stäbchen und Zapfen Defekte [1, 136, 176]. Die Verarbeitung visueller Informationen ist gestört [136].

Es ist anzunehmen, dass Tiere der *Bmal1*^{-/-} Gruppe aufgrund ihres gestörten zirkadianen Schrittmachers zu zufälligen Zeitpunkten erwachen und nicht fähig sind, wie die ebenfalls nachtaktiven Wildtyp-Tiere zu Beginn der Dunkelphase die Aktivität aufzunehmen. Wie auch in früheren Arbeiten beschrieben, scheint der Verlust des Uhrgens *Bmal1* hier in einer Veränderung zirkadianen Verhaltens mit fehlender Antizipationsfähigkeit der Nacht zu resultieren [135]. Wichtig zu berücksichtigen ist an dieser Stelle, ob die Tiere im RH oder außerhalb davon ruhen: Wenn die *Bmal1*^{-/-} Mäuse innerhalb des RH schlafen, erwachen sie in Dunkelheit und verlassen das RH, um dann außerhalb entweder Licht oder Dunkelheit vorzufinden. Wenn sie außerhalb des RH auf Licht stoßen, sind die Tiere aufgrund der widersprüchlichen Information verwirrt und ge-

hen unter Umständen in das RH zurück. Bei Dunkelheit hingegen sind die Tiere bis zur nächsten Lichtphase aktiv [1]. Die Bmal1-/- Kontrollgruppe ohne RH findet bei Erwachen in der Lichtphase Licht vor, dieses kann sofort wahrgenommen werden und unterbindet sofort die Aktivität (Masking). Wenn sie in der Dunkelheit aufwachen, bleiben sie ebenso wie die Mäuse der RH-Gruppe bis zur nächsten Lichtphase aktiv.

Statistisch bestand bei Bmal1-/- Tieren mit RH kein signifikanter Unterschied in der Aktivität in Dunkel- oder Lichtphase, zirkadianes Verhalten zeigte sich folglich abgewandelt. Die höhere lokomotorische Aktivität der Bmal1-/- Kontrollgruppe gegenüber denen mit RH, besonders in der Dunkelphase, lässt sich also dadurch erklären, dass diese Tiere entscheidender von der Lichtinformation profitieren können (vgl. Abbildung 1C in Publikation [1]).

Daraus ist abzuleiten, dass der Einsatz des RH in insbesondere behavioralen Studien an Mäusen mit defektem visuellem System oder molekularem Uhrwerk möglicherweise Untersuchungsergebnisse verfälschen kann. Auch bei Studien, die bestimmte, tageszeitabhängige Körperfunktionen beleuchten, sollte der Gebrauch des RH kritisch geprüft werden. Unsere Ergebnisse demonstrieren außerdem, dass der Einsatz des RH in Wildtyp-Mäusen keinen Einfluss auf die spontane lokomotorische Aktivität nahm. Dies deutet zunächst einmal darauf hin, dass eine adäquate Auswertung von Studien mit Fragestellungen zum zirkadianen Verhalten von Wildtyp-Mäusen mit RH-Enrichment möglich wäre.

3.3 Auswirkungen auf das molekulare Uhrwerk

In unserer Arbeit haben wir uns weiterhin mit den Effekten des RH auf zellulärer Ebene befasst. Unser Anspruch war hierbei zu rekonstruieren, ob durch das RH objektivierbare Veränderungen in Immunreaktionen entstehen. Wie in Kapitel 1.4 skizziert, wird das Uhrgen Per1 nach vorausgehender Einleitung durch die Transkriptionsfaktoren BMAL1 und CLOCK rhythmisch transkribiert, mit Höchstständen in der Dunkelphase [105, 106, 112]. Die translatierten Produkte der Uhrgene hemmen, einer negativen Rückkopplungsschleife entsprechend, wiederum ihre eigene Synthese [180]. Die rhythmische Genexpression bildet auf diese Weise die Basis für eine rhythmische Zell- und letztlich Organfunktion. Per1 und Per2 spielen zudem eine große Rolle im Licht-induzierten Entrain-

ment [181]. So wird die Transkription auch als unmittelbare Antwort auf Lichtexposition angestoßen (s. Kapitel 1.4.1) [182].

Unseren Erwartungen entsprechend, war die PER1-Immunreaktion im SCN der Wildtyp-Mäuse stärker in der frühen Dunkelfase (ZT14) und schwächer in der frühen Lichtphase (ZT02) [183, 184]. Dies traf ebenso für Bmal1^{+/+} Mäuse mit RH und Bmal1^{-/-} Mäuse (Kontrollgruppe) zu.

Die Expression von PER1 in der Bmal1^{-/-} Kontrollgruppe zeigte allerdings Unterschiede, die mit unseren vorherigen Beobachtungen einhergehen: Bmal1 ist für die Licht-induzierte PER1-Expression entbehrlich [185]. Es ist zu betonen, dass die Amplitude der PER1-Immunreaktion zum Zeitpunkt ZT14 der Wildtyp-Kontrollgruppe höher im Vergleich zur Selbigen der Bmal1^{-/-} Gruppe war. Grund dafür ist wahrscheinlich, dass die Wildtyp-Mäuse neben Licht als Treiber für die rhythmische Expression auch über ein intaktes molekulares Uhrwerk verfügen. Den Bmal1^{-/-} Tieren bleibt hingegen nur das Licht als Trigger.

Erstaunlicherweise ergab die Auswertung der Bmal1^{-/-} Tiere mit RH ebenfalls eine starke PER1-Immunreaktion bei ZT14 und eine schwächere Reaktion bei ZT02. Dies hat uns überrascht, da wir bei den Mäusen keine analoge rhythmische lokomotorische Aktivität (s. o.) beobachten konnten. Diese Verknüpfung deutet darauf hin, dass das Licht, welches die Mäuse im Käfig während der Lichtphase registrieren, die rhythmische Per1-Expression im SCN hinreichend antreiben kann [1]. Um diese Hypothese zu belegen, entschieden wir uns, p-ERK im SCN immunhistochemisch darzustellen und zu analysieren. Die Expression von p-ERK wird intensiv durch Licht gefördert, p-ERK per se ist bedeutsam in der Aktivierung CRE/CREB-vermittelter Transkriptionssignalwege [130, 186, 187]. Es zeigte sich tatsächlich in allen vier Subgruppen, dass die p-ERK-Immunreaktion zum Zeitpunkt ZT02 höher war als bei ZT14 [1].

Es fiel auf, dass die Amplitude der p-ERK-Immunreaktion in Wildtypmäusen mit RH bei ZT02 schwächer ausfiel als bei der entsprechenden Kontrollgruppe (Bmal1^{+/+} ohne RH). Bei den Bmal1^{-/-} Tieren mit RH war im Vergleich die Amplitude noch stärker erniedrigt. Es ist daher anzunehmen, dass die Anzahl der p-ERK-positiven SCN-Zellen möglicherweise mit der Stärke des Lichteingangs korreliert, welche wiederum auch von der Fähigkeit zur Lichtperzeption der Tiere abhängt [1]. Überdies legen unsere Auswertungen nahe, dass unabhängig einer rhythmischen Aktivität das Licht mit dem die Bmal1^{-/-} Mäuse in der

Lichtphase außerhalb des RH bestrahlt werden, für eine Aktivierung der p-ERK Expression im SCN genügt (s. o.) [1].

3.4 Stressbelastung der Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit den Levels an Corticosteronen im Serum der Versuchstiere beschäftigt, da diese Hinweise auf die Stressbelastung geben können [165]. Wir beabsichtigten zu evaluieren, ob die Tiere durch das RH tatsächlich profitieren. Wie erwartet, waren in allen vier Subgruppen die Corticosteron-Spiegel zum Zeitpunkt ZT14 höher als bei ZT02, welches mit früheren Beobachtungen der rhythmischen Distribution einhergeht [188]. Sowohl der LD-Zyklus als auch die rhythmische Aktivität der Tiere treiben die rhythmische Corticosteron-Ausschüttung an (ebd.). Die rhythmische Expression von Uhrengenen im SCN ist eng an die selbige in der Nebennierenrinde geknüpft [1, 188].

Wir konnten keine Unterschiede in den Corticosteron-Werten bei ZT02 und ZT14 in allen Subgruppen feststellen, was impliziert, dass der Verzicht auf das RH nicht mit höheren Corticosteronspiegeln und mithin Stresslevels einhergeht. Dies ist auch vor dem Hintergrund des Einsatzes als Enrichment-Maßnahme zu evaluieren.

3.5 Schlussfolgerung

Bmal1-/- Mäuse weisen bekanntermaßen neben einem defekten molekularen Uhrwerk einen gestörten Lichteingang in das zirkadiane System auf [132]. Unsere Daten weisen darauf hin, dass der Einsatz des RH bei diesen Tieren die rhythmische spontane lokomotorische Aktivität verändert. Zugleich wird die rhythmische Expression von PER1 und p-ERK im SCN geschwächt.

Mäuse mit und ohne RH weisen ähnliche Spiegel an Corticosteronen im Serum auf, was einen geringen Einfluss der Enrichment-Maßnahme auf die Stressbelastung der Tiere nahelegt. Selbstverständlich ist die alleinige Bestimmung von Corticosteronen nicht ausreichend, um das Wohlbefinden der untersuchten Tiere zu bemessen. Hier sind weitere anschließende Begutachtungen unerlässlich. Aufgrund dessen raten wir zur sorgfältigen Abwägung beim Einsatz des RH bei Studien an Mäusen mit einem gestörten zirkadianen System und/ oder einem

gestörten Lichteingang in das zirkadiane System, da eine Veränderung der rhythmischen Aktivität zu befürchten ist. Diese Empfehlung gilt nachdrücklich nicht nur für Fragestellungen, die aktive Verhaltensweisen von Tieren untersuchen, sondern auch für Studien, bei denen die Expression von Genen oder Proteinen untersucht werden, die einer tageszeitlichen Rhythmik unterliegen. Standardisierungsziele könnten womöglich nicht umgesetzt werden.

Gleicherweise sollte die Verwendung des RH bei Experimenten, in denen bestimmte, tageszeitabhängige physiologische Prozesse Gegenstand der Erhebung sind, prüfend überdacht werden. Die Auswirkungen von Enrichment-Maßnahmen auf behaviorale, physiologische und molekularbiologische Parameter sollte bereits in der Planung des Studiendesigns Abbildung finden.

Unsere Studienergebnisse deuten ferner an, dass die rhythmische Expression von PER1 und p-ERK im SCN weniger anfällig für Störungen der retinalen Funktion zu sein scheint und unabhängig von rhythmischer lokomotorischer Aktivität beurteilt werden sollte [1]. Die Resultate legten ergänzend nahe, dass auch bei Wildtyp-Mäusen quantifizierbare Veränderungen durch das RH eintreten. So zeigte sich, dass die p-ERK-Immunreaktion im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrollgruppe signifikant erniedrigt war (vgl. Kapitel 3.3)

Dessen ungeachtet belegt eine Vielzahl von Untersuchungen, besonders in den vergangenen Jahren, dass der Einsatz von Enrichment für das Wohlbefinden und die Gesundheit von Tieren in Laborhaltung einen deutlichen Nutzen bieten kann. Durch die Rechtsverbindlichkeit der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates ist innerhalb der EU-Staaten vereinbart, dass Tieren in Laborhaltung ein definiertes Maß an Enrichment zur Entfaltung ihrer ethologischen spezifischen Bedürfnisse zusteht. Der angebotene Standardkäfig sollte also nicht mehr mager und anspruchslos sein, sondern auch, der „Verfeinerungsdevise“ der 3R-Prinzipien folgend, ein Refugium und Beschäftigung bieten.

Es gilt weiterhin, die Wechselwirkungen von Enrichment vor dem Hintergrund der Validität sowie Reproduzierbarkeit von Studienresultaten zu analysieren.

4 Literaturverzeichnis

1. Ozturk, M., et al., *Does a Red House Affect Rhythms in Mice with a Corrupted Circadian System?* Int J Mol Sci, 2021. **22**(5).
2. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Coordination of circadian timing in mammals*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 935-41.
3. Roenneberg, T. and M. Merrow, *Circadian clocks - the fall and rise of physiology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(12): p. 965-71.
4. de Mairan, J.-J., *Observation botanique*. Histoire de l'Académie Royale des Sciences Paris, 1729.
5. Dvornyk, V., O. Vinogradova, and E. Nevo, *Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2495-500.
6. Bell-Pedersen, D., et al., *Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(7): p. 544-56.
7. von Gall, C., *The Effects of Light and the Circadian System on Rhythmic Brain Function*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(5): p. 2778.
8. Atamian, H.S., et al., *Circadian regulation of sunflower heliotropism, floral orientation, and pollinator visits*. Science, 2016. **353**(6299): p. 587-90.
9. Rosato, E., E. Tauber, and C.P. Kyriacou, *Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(6): p. 729-38.
10. Abruzzi, K.C., et al., *Drosophila CLOCK target gene characterization: implications for circadian tissue-specific gene expression*. Genes Dev, 2011. **25**(22): p. 2374-86.
11. Ishiura, M., et al., *Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria*. Science, 1998. **281**(5382): p. 1519-23.
12. Ouyang, Y., et al., *Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8660-4.
13. Merrow, M., et al., *A fungus among us: the Neurospora crassa circadian system*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(4): p. 279-85.
14. Zhang, R., et al., *A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(45): p. 16219-24.
15. Morf, J. and U. Schibler, *Body temperature cycles: gatekeepers of circadian clocks*. Cell Cycle, 2013. **12**(4): p. 539-40.
16. Vandewalle, G., et al., *Robust circadian rhythm in heart rate and its variability: influence of exogenous melatonin and photoperiod*. J Sleep Res, 2007. **16**(2): p. 148-55.
17. Hastings, M.H., A.B. Reddy, and E.S. Maywood, *A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(8): p. 649-61.
18. Casetta, I., et al., *Circadian variability in hemorrhagic stroke*. JAMA, 2002. **287**(10): p. 1266-7.
19. Cohen, M.C., et al., *Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death*. Am J Cardiol, 1997. **79**(11): p. 1512-6.

20. Fodor, D.M., M.M. Marta, and L. Perju-Dumbrava, *Implications of Circadian Rhythm in Stroke Occurrence: Certainties and Possibilities*. Brain Sci, 2021. **11**(7).
21. Dibner, C. and U. Schibler, *Circadian timing of metabolism in animal models and humans*. J Intern Med, 2015. **277**(5): p. 513-27.
22. Ingenwerth, M., et al., *Perturbation of the molecular clockwork in the SCN of non-obese diabetic mice prior to diabetes onset*. Chronobiol Int, 2016. **33**(10): p. 1369-1375.
23. Landgraf, D., M.J. McCarthy, and D.K. Welsh, *Circadian clock and stress interactions in the molecular biology of psychiatric disorders*. Curr Psychiatry Rep, 2014. **16**(10): p. 483.
24. Sahar, S. and P. Sassone-Corsi, *Circadian clock and breast cancer: a molecular link*. Cell Cycle, 2007. **6**(11): p. 1329-31.
25. Sahar, S. and P. Sassone-Corsi, *Metabolism and cancer: the circadian clock connection*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(12): p. 886-96.
26. Rosbash, M. and J.S. Takahashi, *Circadian rhythms: the cancer connection*. Nature, 2002. **420**(6914): p. 373-4.
27. Korf, H.-W. and C. von Gall, *Circadian Physiology*, in *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, D.W. Pfaff and N.D. Volkow, Editors. 2016, Springer New York: New York, NY. p. 2203-2239.
28. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Molecular analysis of mammalian circadian rhythms*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 647-76.
29. Weaver, D.R., *The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective*. Journal of biological rhythms, 1998. **13**(2): p. 100-112.
30. Gillette, M.U. and S.M. Reppert, *The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro*. Brain Res Bull, 1987. **19**(1): p. 135-9.
31. van Esseveldt, K.E., M.N. Lehman, and G.J. Boer, *The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited*. Brain Res Brain Res Rev, 2000. **33**(1): p. 34-77.
32. Hafner, M., H. Koepl, and D. Gonze, *Effect of network architecture on synchronization and entrainment properties of the circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus*. PLoS Comput Biol, 2012. **8**(3): p. e1002419.
33. Sollars, P.J. and G.E. Pickard, *The Neurobiology of Circadian Rhythms*. Psychiatr Clin North Am, 2015. **38**(4): p. 645-65.
34. Pickard, G.E. and F.W. Turek, *Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei*. Science, 1982. **215**(4536): p. 1119-21.
35. Mohawk, J.A., C.B. Green, and J.S. Takahashi, *Central and peripheral circadian clocks in mammals*. Annu Rev Neurosci, 2012. **35**: p. 445-62.
36. Cuninkova, L. and S.A. Brown, *Peripheral circadian oscillators: interesting mechanisms and powerful tools*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1129**: p. 358-70.
37. Hastings, M.H., E.S. Maywood, and M. Brancaccio, *Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus*. Nat Rev Neurosci, 2018. **19**(8): p. 453-469.
38. Mosko, S. and R.Y. Moore, *Neonatal suprachiasmatic nucleus ablation: absence of functional and morphological plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(12): p. 6243-6.

39. Ruby, N.F., et al., *Ablation of suprachiasmatic nucleus alters timing of hibernation in ground squirrels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9864-8.
40. Kafka, M.S., P.J. Marangos, and R.Y. Moore, *Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors*. Brain Res, 1985. **327**(1-2): p. 344-7.
41. Sollars, P.J. and G.E. Pickard, *Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic grafts containing the suprachiasmatic nucleus: graft/host interconnections*. Chronobiol Int, 1998. **15**(5): p. 513-33.
42. Ralph, M.R. and M.N. Lehman, *Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker*. Trends Neurosci, 1991. **14**(8): p. 362-6.
43. Sagan, K.P., et al., *Quality of Life and Sleep in Patients with Pituitary Adenoma in Relation to Tumor Type and Compression of the Optic Chiasm*. J Clin Med, 2021. **10**(9).
44. Joustra, S.D., et al., *Alterations in diurnal rhythmicity in patients treated for nonfunctioning pituitary macroadenoma: a controlled study and literature review*. Eur J Endocrinol, 2014. **171**(2): p. 217-28.
45. Zielonka, D., et al., *Melatonin and cortisol profiles in patients with pituitary tumors*. Neurol Neurochir Pol, 2015. **49**(1): p. 65-9.
46. Welsh, D.K., J.S. Takahashi, and S.A. Kay, *Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 551-77.
47. Bos, N.P. and M. Mirmiran, *Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus*. Brain Res, 1990. **511**(1): p. 158-62.
48. Mei, L., et al., *Long-term in vivo recording of circadian rhythms in brains of freely moving mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(16): p. 4276-4281.
49. Liu, C. and S.M. Reppert, *GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock*. Neuron, 2000. **25**(1): p. 123-8.
50. vanderLeest, H.T., et al., *Phase of the electrical activity rhythm in the SCN in vitro not influenced by preparation time*. Chronobiol Int, 2009. **26**(6): p. 1075-89.
51. Colwell, C.S., *Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus*. J Neurobiol, 2000. **43**(4): p. 379-88.
52. Long, M.A., et al., *Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus*. Nat Neurosci, 2005. **8**(1): p. 61-6.
53. Achilly, N.P., *Properties of VIP+ synapses in the suprachiasmatic nucleus highlight their role in circadian rhythm*. J Neurophysiol, 2016. **115**(6): p. 2701-4.
54. Moore, R.Y. and J.C. Speh, *GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system*. Neuroscience letters, 1993. **150**(1): p. 112-116.
55. Lee, H.S., H.J. Billings, and M.N. Lehman, *The suprachiasmatic nucleus: a clock of multiple components*. J Biol Rhythms, 2003. **18**(6): p. 435-49.
56. Antle, M.C. and R. Silver, *Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock*. Trends Neurosci, 2005. **28**(3): p. 145-51.
57. Morin, L.P., *Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system*. Exp Neurol, 2013. **243**: p. 4-20.

58. Moore, R.Y. and N.J. Lenn, *A retinohypothalamic projection in the rat*. J Comp Neurol, 1972. **146**(1): p. 1-14.
59. Hattar, S., et al., *Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1065-70.
60. Saper, C.B., et al., *The hypothalamic integrator for circadian rhythms*. Trends Neurosci, 2005. **28**(3): p. 152-7.
61. Silver, R. and J. LeSauter, *Efferent signals of the suprachiasmatic nucleus*. J Biol Rhythms, 1993. **8 Suppl**: p. S89-92.
62. Sylvester, C.M., K.E. Krout, and A.D. Loewy, *Suprachiasmatic nucleus projection to the medial prefrontal cortex: a viral transneuronal tracing study*. Neuroscience, 2002. **114**(4): p. 1071-80.
63. *Leaf-nosed bat*, in *Encyclopædia Britannica*. 2009, Encyclopædia Britannica Online.
64. Watts, A.G. and L.W. Swanson, *Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat*. J Comp Neurol, 1987. **258**(2): p. 230-52.
65. Christ, J., *[Anatomy of the tuber cinereum in the adult, with special reference to its relation to hypophysis]*. Dtsch Z Nervenheilkd, 1951. **165**(3-4): p. 340-408.
66. Acosta-Galvan, G., et al., *Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(14): p. 5813-8.
67. Khodai, T. and S.M. Luckman, *Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus Neurons Under the Magnifying Glass*. Endocrinology, 2021. **162**(10).
68. Dumbell, R., et al., *Dissociation of Molecular and Endocrine Circadian Rhythms in Male Mice Lacking Bmal1 in the Adrenal Cortex*. Endocrinology, 2016. **157**(11): p. 4222-4233.
69. Engeland, W.C., et al., *Sex Differences in Adrenal Bmal1 Deletion-Induced Augmentation of Glucocorticoid Responses to Stress and ACTH in Mice*. Endocrinology, 2019. **160**(10): p. 2215-2229.
70. Cheifetz, P.N., *The daily rhythm of the secretion of corticotrophin and corticosterone in rats and mice*. J Endocrinol, 1971. **49**(3): p. xi-xii.
71. Carnes, M., et al., *Pulsatile ACTH secretion: variation with time of day and relationship to cortisol*. Peptides, 1988. **9**(2): p. 325-31.
72. Meier, A.H., *Daily variation in concentration of plasma corticosteroid in hypophysectomized rats*. Endocrinology, 1976. **98**(6): p. 1475-9.
73. Ottenweller, J.E. and A.H. Meier, *Adrenal innervation may be an extrapituitary mechanism able to regulate adrenocortical rhythmicity in rats*. Endocrinology, 1982. **111**(4): p. 1334-8.
74. Korf, H.-W. and C. von Gall, *Circadian Physiology*, in *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, D.W. Pfaff, Editor. 2013, Springer New York: New York, NY. p. 1813-1845.
75. Barnard, A.R., et al., *Residual photosensitivity in mice lacking both rod opsin and cone photoreceptor cyclic nucleotide gated channel 3 alpha subunit*. Vis Neurosci, 2004. **21**(5): p. 675-83.

76. Guler, A.D., et al., *Multiple photoreceptors contribute to nonimage-forming visual functions predominantly through melanopsin-containing retinal ganglion cells*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007. **72**: p. 509-15.
77. Wilhelm, B.J., *[The eye of the inner clock - pupil research in a new light]*. Klin Monbl Augenheilkd, 2010. **227**(11): p. 840-4.
78. Berson, D.M., F.A. Dunn, and M. Takao, *Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1070-3.
79. Lucas, R.J., R.H. Douglas, and R.G. Foster, *Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice*. Nat Neurosci, 2001. **4**(6): p. 621-6.
80. Bailes, H.J. and R.J. Lucas, *Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light (lambda_{max} approximately 479 nm) supporting activation of G(q/11) and G(i/o) signalling cascades*. Proc Biol Sci, 2013. **280**(1759): p. 20122987.
81. Pickard, G.E. and P.J. Sollars, *Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2012. **162**: p. 59-90.
82. Berson, D.M., *Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors*. Trends Neurosci, 2003. **26**(6): p. 314-20.
83. Soerensen, D., M. Moeller, and L. Larsen, *The Use of the Techniplast Mouse House ® in Four Strains of Mice*. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, 2009. **36**.
84. Jacobs, G.H., J.A. Fenwick, and G.A. Williams, *Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights*. J Exp Biol, 2001. **204**(Pt 14): p. 2439-46.
85. Jacobs, G.H., J. Neitz, and J.F. Deegan, *Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 655-656.
86. Mouland, J.W., et al., *Cones Support Alignment to an Inconsistent World by Suppressing Mouse Circadian Responses to the Blue Colors Associated with Twilight*. Curr Biol, 2019. **29**(24): p. 4260-4267 e4.
87. Gooley, J.J., et al., *Spectral responses of the human circadian system depend on the irradiance and duration of exposure to light*. Sci Transl Med, 2010. **2**(31): p. 31ra33.
88. Perrin, F., et al., *Nonvisual responses to light exposure in the human brain during the circadian night*. Curr Biol, 2004. **14**(20): p. 1842-6.
89. Zeitzer, J.M., et al., *Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression*. J Physiol, 2000. **526 Pt 3**: p. 695-702.
90. Butler, M.P. and R. Silver, *Divergent photic thresholds in the non-image-forming visual system: entrainment, masking and pupillary light reflex*. Proc Biol Sci, 2011. **278**(1706): p. 745-50.
91. Nelson, D.E. and J.S. Takahashi, *Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (Mesocricetus auratus)*. J Physiol, 1991. **439**: p. 115-45.
92. Walmsley, L., et al., *Colour as a signal for entraining the mammalian circadian clock*. PLoS Biol, 2015. **13**(4): p. e1002127.
93. Spitschan, M., R.J. Lucas, and T.M. Brown, *Chromatic clocks: Color opponency in non-image-forming visual function*. Neurosci Biobehav Rev, 2017. **78**: p. 24-33.

94. Colwell, C.S., *NMDA-evoked calcium transients and currents in the suprachiasmatic nucleus: gating by the circadian system*. Eur J Neurosci, 2001. **13**(7): p. 1420-8.
95. Ding, J.M., et al., *A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock*. Nature, 1998. **394**(6691): p. 381-4.
96. Swanson, L.W., W.M. Cowan, and E.G. Jones, *An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the albino rat and the cat*. J Comp Neurol, 1974. **156**(2): p. 143-63.
97. Brauer, K. and E. Winkelmann, *[Topography of the retino-geniculate endings and classification of relay-cells in the corpus geniculatum laterale, pars dorsalis (Cgld) of albino rat in relation to the X- and Y-system]*. Verh Anat Ges, 1977(71 Pt 2): p. 973-7.
98. Johnson, R.F., R.Y. Moore, and L.P. Morin, *Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster*. Brain Res Bull, 1989. **22**(2): p. 411-22.
99. Konopka, R.J. and S. Benzer, *Clock mutants of Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(9): p. 2112-6.
100. Stoleru, D., et al., *A resetting signal between Drosophila pacemakers synchronizes morning and evening activity*. Nature, 2005. **438**(7065): p. 238-42.
101. Guo, F., et al., *Circadian neuron feedback controls the Drosophila sleep-activity profile*. Nature, 2016. **536**(7616): p. 292-7.
102. Huang, R.C., *The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine*. Biomed J, 2018. **41**(1): p. 5-8.
103. Sun, Z.S., et al., *RIGUI, a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1003-11.
104. Tei, H., et al., *Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene*. Nature, 1997. **389**(6650): p. 512-6.
105. Hogenesch, J.B., et al., *The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5474-9.
106. Jin, X., et al., *A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock*. Cell, 1999. **96**(1): p. 57-68.
107. King, D.P., et al., *Positional cloning of the mouse circadian clock gene*. Cell, 1997. **89**(4): p. 641-53.
108. Kume, K., et al., *mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop*. Cell, 1999. **98**(2): p. 193-205.
109. Lee, C., et al., *Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock*. Cell, 2001. **107**(7): p. 855-67.
110. Partch, C.L., C.B. Green, and J.S. Takahashi, *Molecular architecture of the mammalian circadian clock*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(2): p. 90-9.
111. Buhr, E.D. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the Mammalian circadian clock*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 3-27.
112. von Gall, C., et al., *Clock gene protein mPER1 is rhythmically synthesized and under cAMP control in the mouse pineal organ*. J Neuroendocrinol, 2001. **13**(4): p. 313-6.
113. Albus, H., et al., *Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei*. Curr Biol, 2002. **12**(13): p. 1130-3.

114. van der Horst, G.T., et al., *Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms*. *Nature*, 1999. **398**(6728): p. 627-30.
115. Tosini, G. and M. Menaker, *Circadian rhythms in cultured mammalian retina*. *Science*, 1996. **272**(5260): p. 419-21.
116. Yagita, K., et al., *Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts*. *Science*, 2001. **292**(5515): p. 278-81.
117. Vitaterna, M.H., et al., *Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior*. *Science*, 1994. **264**(5159): p. 719-25.
118. Pappa, K.I., et al., *The major circadian pacemaker ARNT-like protein-1 (BMAL1) is associated with susceptibility to gestational diabetes mellitus*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013. **99**(2): p. 151-7.
119. Woon, P.Y., et al., *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(36): p. 14412-7.
120. Aschoff, J., et al., *Re-entrainment of circadian rhythms after phase-shifts of the Zeitgeber*. *Chronobiologia*, 1975. **2**(1): p. 23-78.
121. Aschoff, J., *Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik*. *Naturwissenschaften*, 1954. **41**(3): p. 49-56.
122. Rensing, L. and P. Ruoff, *Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases*. *Chronobiol Int*, 2002. **19**(5): p. 807-64.
123. Mistlberger, R.E. and D.J. Skene, *Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2004. **79**(3): p. 533-56.
124. Roenneberg, T., S. Daan, and M. Mewes, *The art of entrainment*. *J Biol Rhythms*, 2003. **18**(3): p. 183-94.
125. Chen, D., et al., *Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(23): p. 13468-73.
126. Hannibal, J., *Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract*. *Cell Tissue Res*, 2002. **309**(1): p. 73-88.
127. Ginty, D.D., et al., *Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock*. *Science*, 1993. **260**(5105): p. 238-41.
128. Ding, J.M., et al., *Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide*. *J Neurosci*, 1997. **17**(2): p. 667-75.
129. Gau, D., et al., *Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock*. *Neuron*, 2002. **34**(2): p. 245-53.
130. Coogan, A.N. and H.D. Piggins, *Circadian and photic regulation of phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster*. *J Neurosci*, 2003. **23**(7): p. 3085-93.
131. Phillips, A.J., et al., *Mammalian rest/activity patterns explained by physiologically based modeling*. *PLoS Comput Biol*, 2013. **9**(9): p. e1003213.
132. Pfeffer, M., H.W. Korf, and C. von Gall, *Chronotype and stability of spontaneous locomotor activity rhythm in BMAL1-deficient mice*. *Chronobiol Int*, 2015. **32**(1): p. 81-91.

133. Shuboni, D.D., et al., *Acute behavioral responses to light and darkness in nocturnal Mus musculus and diurnal Arvicanthis niloticus*. J Biol Rhythms, 2012. **27**(4): p. 299-307.
134. Hattar, S., et al., *Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 76-81.
135. Bunger, M.K., et al., *Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals*. Cell, 2000. **103**(7): p. 1009-17.
136. Baba, K., et al., *Removal of clock gene Bmal1 from the retina affects retinal development and accelerates cone photoreceptor degeneration during aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(51): p. 13099-13104.
137. Kondratov, R.V., et al., *Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1868-73.
138. Manouze, H., et al., *Effects of Single Cage Housing on Stress, Cognitive, and Seizure Parameters in the Rat and Mouse Pilocarpine Models of Epilepsy*. eNeuro, 2019. **6**(4).
139. Mumtaz, F., et al., *Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model-A comprehensive review*. Biomed Pharmacother, 2018. **105**: p. 1205-1222.
140. Olsson, I.A.S. and K. Westlund, *More than numbers matter: The effect of social factors on behaviour and welfare of laboratory rodents and non-human primates*. Applied Animal Behaviour Science, 2007. **103**(3-4): p. 229-254.
141. Garner, J.P., *Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes*. ILAR J, 2005. **46**(2): p. 106-17.
142. Langgartner, D., et al., *Light and water are not simple conditions: fine tuning of animal housing in male C57BL/6 mice*. Stress, 2017. **20**(1): p. 10-18.
143. Scariot, P.P.M., et al., *Housing conditions modulate spontaneous physical activity, feeding behavior, aerobic running capacity and adiposity in C57BL/6J mice*. Horm Behav, 2019. **115**: p. 104556.
144. Wolfer, D.P., et al., *Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour*. Nature, 2004. **432**(7019): p. 821-2.
145. Burn, C. and R. Popat, *A tunnel is not enough: mice benefit from in-cage provision of a communal shelter as well as a handling tunnel*. Animal Technology and Welfare, 2021. **20**: p. 203-210.
146. Van de Weerd, H.A., et al., *Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice*. Physiol Behav, 1997. **62**(5): p. 1019-28.
147. Konkle, A.T., et al., *Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010. **49**(4): p. 427-36.
148. Carlstead, K. and D.J. Shepherdson, *Effects of environmental enrichment on reproduction*. Zoo Biology, 1994. **13**: p. 447-458.
149. Berry, R.J., *The natural history of the house mouse*. Field Study, 1970. **3**: p. 219-262.

150. Williamson, C.M., B. Franks, and J.P. Curley, *Mouse Social Network Dynamics and Community Structure are Associated with Plasticity-Related Brain Gene Expression*. Front Behav Neurosci, 2016. **10**: p. 152.
151. Olsson, I.A. and K. Dahlborn, *Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment"*. Lab Anim, 2002. **36**(3): p. 243-70.
152. Toth, L.A., *The influence of the cage environment on rodent physiology and behavior: Implications for reproducibility of pre-clinical rodent research*. Exp Neurol, 2015. **270**: p. 72-7.
153. Tsai, P.P., et al., *Impact of environmental enrichment in mice. 1: effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains*. Lab Anim, 2002. **36**(4): p. 411-9.
154. Bayne, K., *Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives*. Animal Model Exp Med, 2018. **1**(2): p. 82-90.
155. Poole, T., *Happy animals make good science*. Lab Anim, 1997. **31**(2): p. 116-24.
156. Wirz, A., et al., *Response, use and habituation to a mouse house in C57BL/6J and BALB/c mice*. Exp Anim, 2015. **64**(3): p. 281-93.
157. Russell, W.M.S. and R.L. Burch, *The principles of humane experimental technique*. 1959: Methuen.
158. Tannenbaum, J. and B.T. Bennett, *Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015. **54**(2): p. 120-32.
159. MacArthur Clark, J., *The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement*. Br J Nutr, 2018. **120**(s1): p. S1-s7.
160. Taylor, K., *Reporting the implementation of the Three Rs in European primate and mouse research papers: are we making progress?* Altern Lab Anim, 2010. **38**(6): p. 495-517.
161. Avey, M.T., N. Fenwick, and G. Griffin, *The use of systematic reviews and reporting guidelines to advance the implementation of the 3Rs*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015. **54**(2): p. 153-62.
162. Macri, S., et al., *The Directive 2010/63/EU on animal experimentation may skew the conclusions of pharmacological and behavioural studies*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2380.
163. Kennaway, D.J., *The role of circadian rhythmicity in reproduction*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(1): p. 91-101.
164. Rudic, R.D., et al., *BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis*. PLoS Biol, 2004. **2**(11): p. e377.
165. Gong, S., et al., *Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0117503.
166. Ralph, C.R. and A.J. Tilbrook, *INVITED REVIEW: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare*. J Anim Sci, 2016. **94**(2): p. 457-70.
167. Bailoo, J.D., et al., *Effects of Cage Enrichment on Behavior, Welfare and Outcome Variability in Female Mice*. Front Behav Neurosci, 2018. **12**: p. 232.

168. Abou-Ismaïl, U.A. and H.D. Mahboub, *The effects of enriching laboratory cages using various physical structures on multiple measures of welfare in singly-housed rats*. Lab Anim, 2011. **45**(3): p. 145-53.
169. Broom, D.M., *A history of animal welfare science*. Acta Biotheor, 2011. **59**(2): p. 121-37.
170. Baumans, V., *Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals*. Rev Sci Tech, 2005. **24**(2): p. 503-13.
171. Benaroya-Milshtein, N., et al., *Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(5): p. 1341-7.
172. Nithianantharajah, J. and A.J. Hannan, *Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(9): p. 697-709.
173. Benaroya-Milshtein, N., et al., *Environmental enrichment augments the efficacy of idiotype vaccination for B-cell lymphoma*. J Immunother, 2007. **30**(5): p. 517-22.
174. Xiao, R., et al., *Enhancing Effects of Environmental Enrichment on the Functions of Natural Killer Cells in Mice*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 695859.
175. Pfeffer, M., et al., *The mammalian molecular clockwork controls rhythmic expression of its own input pathway components*. J Neurosci, 2009. **29**(19): p. 6114-23.
176. Storch, K.F., et al., *Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information*. Cell, 2007. **130**(4): p. 730-741.
177. Storch, K.F., et al., *Physiological importance of a circadian clock outside the suprachiasmatic nucleus*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007. **72**: p. 307-18.
178. Mrosovsky, N. and S. Hattar, *Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice*. Chronobiol Int, 2003. **20**(6): p. 989-99.
179. Mrosovsky, N. and S. Thompson, *Negative and positive masking responses to light in retinal degenerate slow (rds/rds) mice during aging*. Vision Res, 2008. **48**(10): p. 1270-3.
180. Shearman, L.P., et al., *Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1013-9.
181. Albrecht, U., et al., *A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light*. Cell, 1997. **91**(7): p. 1055-64.
182. Shigeyoshi, Y., et al., *Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript*. Cell, 1997. **91**(7): p. 1043-53.
183. Hannibal, J., et al., *Spatiotemporal expression pattern of PERIOD 1 and PERIOD 2 in the mouse SCN is dependent on VIP receptor 2 signaling*. Eur J Neurosci, 2019. **50**(7): p. 3115-3132.
184. Hastings, M.H., et al., *Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism*. J Neurosci, 1999. **19**(12): p. RC11.
185. Ramanathan, C., et al., *Compartmentalized expression of light-induced clock genes in the suprachiasmatic nucleus of the diurnal grass rat (Arvicanthis niloticus)*. Neuroscience, 2009. **161**(4): p. 960-9.

186. Smith, V.M., et al., *Temporal changes of light-induced proteins in the SCN following treatment with the serotonin mixed agonist/antagonist BMY7378*. Exp Brain Res, 2015. **233**(9): p. 2723-31.
187. Goldsmith, C.S. and D. Bell-Pedersen, *Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks*. Adv Genet, 2013. **84**: p. 1-39.
188. Sollars, P.J., et al., *Altered entrainment to the day/night cycle attenuates the daily rise in circulating corticosterone in the mouse*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111944.

5 Quellenverzeichnis

Kapitel 1.5.2 Gesetzeslage – Literaturangaben

1. Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 105 des Gesetzes vom 10. August 2021 (BGBl. I S. 3436) geändert worden ist.
2. Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 11. August 2021 (BGBl. I S. 3570) geändert worden ist.
3. Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.
4. Empfehlung der Kommission vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden. (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2007) 2525) (2007/526/EG)
5. Veröffentlichung der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS, Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung: Labormäuse, August 2014
Zugriffsdatum: 15.04.2022 https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/hal_201408Tiergerechte-Haltung-Maus.pdf
6. Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere (SEV Nr. 123, S.19-20, Inkrafttreten 15.06.2006)

Danksagung

An erster Stelle gilt mein herzlichster Dank meiner Doktormutter Professor Dr. Charlotte von Gall für die Überlassung dieses spannenden Projektes, die uneingeschränkte und stets motivierende wissenschaftliche Betreuung über Jahre hinweg und die Einbindung in das von ihr geleitete Institut. Sie konnte mich für die neuroanatomische Grundlagenforschung begeistern.

Ich möchte Dr. Amira A. H. Ali danken, die sich immerzu für mich und meine Fragen Zeit nahm und meine Ansprechpartnerin und meine Freundin wurde. Sie hat nie aufgegeben, bis wir eine Lösung gefunden haben und hat mich immer angespornt. Ihre Unterstützung war für diese Arbeit sehr maßgeblich.

Auch möchte ich Professor Dr. Martin Sager danken, der mich in Tierschutz und Tierversuchkunde unterrichtete, mich während des Projektes begleitete und in der Recherche und Interpretationsphase mit Rat und Tat unterstützte.

Weiterhin geht ein großes Dankeschön an Hanna Bellert, Ursula Lammersen, Angelika Hallenberger, Ralf Fassbender und alle weiteren Mitarbeitenden des Instituts für Anatomie II. Ihre Hilfe und ihre Ratschläge haben dieses Vorhaben ermöglicht.

Ich möchte meiner Familie danken – insbesondere meinen beiden Geschwistern Jülide und Kerem – für ihr offenes Ohr, ihre Anregungen und ihr Dasein.

Vielen Dank