Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut an der
Dr. Senckenbergischen Anatomie
Institut für Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie)
Komm. Direktor: Prof. Dr. Thomas Deller

**Seasonal Variations of Locomotor Activity Rhythms in Melatonin-
Proficient and -Deficient Mice under Seminatural Outdoor
Conditions**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Joshua Metzger

aus Langen

Frankfurt am Main, 2020

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent: PD Dr. Helmut Wicht
Korreferent/in: Prof. Dr. Dr. Robert Sader
2. Korreferent/in: -
Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassungen	4
1.1. Zusammenfassung in deutscher Sprache	4
1.2. Zusammenfassung in englischer Sprache	7
1.3. Übergreifende Zusammenfassung in Deutsch	9
2. Publikation	18
3. Darstellung des eigenen Anteils an der Publikation	32
4. Literaturverzeichnis	323
5. Anhang	36
6. Lebenslauf	37
7. Schriftliche Erklärung	38

1. Zusammenfassungen

1.1. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Einleitung:

Der Alltag der meisten Menschen wird von Terminen bestimmt. Um diese einzuhalten, wird eine Uhr als Hilfsmittel zur Orientierung in der Zeit genutzt. Lässt man sich auf ein gedankliches Experiment ein und entledigt sich seiner Uhr, wird es einem jedoch nicht schwerfallen, sich im Tagesverlauf zu orientieren. Nicht nur der Sonnenstand, sondern auch der wiederkehrende Wechsel von Tag zur Nacht kann dann als Orientierung dienen. Im Laufe der Evolution haben sich Lebewesen aller Art an dieses *Nycthemeron* als Zeitgeber angepasst und ihre Stoffwechselprozesse und Verhaltensweisen daran angeglichen.

Unabhängig von den äußeren Reizen gibt es in nahezu allen Lebewesen eine innere Uhr, die bei Säugetieren im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus lokalisiert ist. In dessen Neuronen wird durch eine intrazelluläre transkriptionelle und translationelle negative Rückkopplungsschleife ein ca. 24 Stunden dauernder („circadianer“) endogener Rhythmus erzeugt, der durch den Wechsel von Tag und Nacht, die Photoperiode, an den astrophysikalischen Tag angepasst wird. Die Ankoppelung dieses Oszillators an die äußeren Zeitgeber wird als „entrainment“ bezeichnet. Der o.g. zentrale Oszillator steuert über verschiedene Ausgangswege die peripheren Uhrwerke. Einer dieser Wege funktioniert mittels des Effekthormons Melatonin, das nachts im Pinealorgan synthetisiert wird. Eine Vielzahl von unterschiedlichsten Zellen besitzen Melatonin-Rezeptoren, wodurch Melatonin u.a. auf deren Genexpression Einfluss nehmen kann. Eine der Hauptfunktionen von Melatonin ist die Anpassung an einen neuen Tag-Nacht-Rhythmus wie z.B. bei Jet-Lag, Schichtarbeit oder auch bei Schlafstörungen.

Bei aller Konstanz der molekularen Mechanismen und Grundlagen weist das circadiane System interindividuelle Unterschiede auf, die zur Unterscheidung verschiedener Chronotypen geführt haben (Spättyp/Eule, Frühtyp /Lerche), die ihr Verhalten gegenüber den externen Zeitgebern unterschiedlich justieren.

In Ergänzung zu dem o.g. Wechsel von hell und dunkel gibt es noch andere abiotische und biotische Einflussfaktoren, die das Verhalten der Organismen gegenüber der Zeit beeinflussen. Dieses Zusammenspiel aus abiotischen bzw. biotischen Faktoren mit der zeitlichen Organisation physiologischer und biochemischer Mechanismen erforscht die Chronobiologie. Ein Weg, die Auswirkungen des Entrainments auf Organismen zu registrieren, ist das Beobachten des Lokomotionsverhalten. Die Aufzeichnungen der Bewegungen im Tagesverlauf können in Aktogrammen optisch dargestellt und anschließend verglichen werden.

In der Vergangenheit haben sich für chronobiologische Untersuchungen zwei Labormäusestämme bewährt: C57Bl/6 und C3H. Die C57Bl/6 tragen eine auch bei Wildmäusen auftretende Spontanmutation in sich, die sie Melatonin-defizient werden lässt. Bei dem C3H Stamm ist dagegen die Ausschüttung von Melatonin intakt, jedoch kommt es bei ihnen bereits im jungen Alter zu einer Retinadegeneration. Die Efferenzen zum SCN sind jedoch vorhanden. Beide Stämme haben ein individuelles rhythmisches lokomotorisches Verhalten und können durch äußere Einflüsse „entrained“ werden.

Bisher wurden die meisten chronobiologischen Analysen unter konstanten Laborbedingungen erstellt. Temperaturschwankungen, Variationen in der Luftfeuchtigkeit oder Lichtintensitätsänderungen bzw. die Beleuchtungsdauer in Verlauf der Jahreszeiten werden im Labor nicht erfasst. Weder Menschen noch Mäuse leben jedoch unter kontrollierten Laborbedingungen. Vielmehr sind sie einer sich stets verändernden Umwelt ausgesetzt. Uns interessierte daher die Frage, wie sich diese variablen abiotischen Faktoren auf das Verhalten der beiden unterschiedlichen Mausstämme auswirken. So begaben wir uns mit unseren Versuchen „ins Freie“. Unsere Außenversuche konzentrierten sich auf

den Einfluss alltäglicher abiotischer Zeitgeber - also Licht, Luft, Sonne, Wind, Geräusch - auf das lokomotorische Verhalten als biorhythmisches „read out“.

Material und Methoden:

Für das Experiment wurden jeweils 6 männliche, erwachsene (10-14 Wochen) Mäuse der oben genannten Mäusestämme in Einzelkäfigen (mit einer Nistbox und Nistmaterial ausgestattet) in den Garten des Dr. Senckenbergischen Institutes für Anatomie positioniert. Futter und Wasser wurden *ad libitum* bereitgestellt. Um die Mäuse von Regen und Fressfeinden zu schützen, wurden die Einzelkäfige in einen bedachten, lichtdurchlässigen, größeren Käfig gestellt. In 10-Minuten-Intervallen wurden die Aktivität jeder einzelnen Maus, die Lichtintensität, die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit aufgenommen. Die Messungen wurden über insgesamt 365 Tage durchgeführt.

Zur Verarbeitung und Visualisierung der Rohdaten benutzen wir ein selbstgeschriebenes Programm auf Basis von Microsoft's Excel, wodurch einzelne Verläufe von Licht, Feuchtigkeit, Temperatur und Aktivität analysiert werden konnten. Zur detaillierteren Untersuchung der lokomotorischen Aktivität in Abhängigkeit der abiotischen Faktoren, unterteilten wir die Tagesgesamtaktivität in Perzentilen. Dabei beschreibt ein Perzentil einen Zeitpunkt, an dem ein gewisser Prozentsatz der Gesamtaktivität abgeleistet wurde. Das 20% Perzentil zeigt z.B. den Zeitpunkt an, an dem 20% der Gesamtaktivität erbracht worden ist.

Aus den Daten wurden folgende Parameter für jede Maus extrahiert: (1) die **Tagesgesamtaktivität**, (2) die **Zeitpunkte [MEZ] der Perzentile** (eine Perzentile beschreibt die Prozentzahl der dazugehörigen geleisteten Gesamtaktivität), (3) der tägliche **Chronotyp** (der Zeitpunkt des Auftretens des 50% Perzentils), (4) die zeitliche **Stabilität des Chronotypes** jedes Einzeltieren, (5) die **Dauer der Aktivitätsphase** (=Zeitraum in [h] zwischen dem Auftreten des 10% und des 90% -Perzentils), (6) **Diurnälitätsindex** (Aktivität in der Lichtphase - Aktivität in der Dunkelfase/Tagesgesamtaktivität. Um die beiden Stämme besser vergleichen zu können, wurden die Daten des jeweiligen Stammes über den Beobachtungszeitraum gemittelt.

Es wurden zusätzlich Korrelationsanalysen (Aktivitätsparameter vs. Licht-, Temperatur und Feuchtigkeitsdaten) in Korrelation gesetzt und Fourier-Analysen zur Ermittlung von Frequenzen und Periodizität in den Aktivitätsdaten durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion:

Alle Mäuse überlebten das Experiment ohne erkennbare gesundheitliche Beeinträchtigungen. Die beiden Mausstämme behielten ihre, aus dem Labor bekannten, jeweils typischen Aktivitätsmuster bei. In der Fourier-Analyse zeigte sich bei beiden Stämmen ein 24-stündiger (diurnaler) Rhythmus, es konnten weder lunare, wöchentliche oder ultradiane Rhythmen gefunden werden. In den Korrelationsanalysen der abiotischen Daten zeigte sich, dass die im Jahresgang sich ändernden Lichtverhältnisse, die bei weitem besten Prädiktoren für den Beginn der allnächtlichen Aktivitätsphase sind. Dabei sind die 10/20% Perzentilen der C3H stark ($r^2=0,79$) und der C57Bl moderat ($r^2=0,3$) an die Licht-/Dunkelphase verknüpft. Für die Dauer der Aktivitätsphase scheint die nächtliche Durchschnittstemperatur der beste Prädiktor zu sein, kann aber nicht die alleinige Ursache dafür sein. Offen bleibt die Frage, welche weiteren unentdeckten Stimuli hauptsächlich zum Ende der Aktivitätsphase beitragen. Kein Zusammenhang gab es zwischen der Luftfeuchte und den gemessenen Aktivitätsparametern.

In der Betrachtung der saisonalen Veränderungen wiesen nur die C3H eine hoch signifikante Regulation ihres Chronotyps, dessen Stabilität, der Tagesgesamtaktivität und der Dauer der

Aktivitätsphase auf. Die melatonin-defizienten C57Bl zeigten keine ausgeprägte saisonale Regulation, was darauf hinweist, dass Melatonin ein wichtiger Bestandteil dieser Regulation sein könnte.

Um die Tag- und Nachtgleichen (*Äquinoktien*) herum zeigten beide Stämme eine gesteigerte Gesamtaktivität. Der zu diesem Zeitpunkt zu beobachtende kurze Übergang zwischen Helligkeit und Dunkelheit und die tägliche Verschiebung der Dämmerungszeitpunkte, die zu diesen Zeitenpunkten schneller erfolgen als zu den anderen Jahreszeiten, scheint die Mäuse zu erregen. Diese erhöhte Aktivität korrelierte mit keinen der gemessenen Parametern oder anderen ungewöhnlichen Beobachtungen.

Am Ende des Versuchs verloren einige C57Bl ihr bekanntes biphasisches Aktivitätsmuster und wechselten in ein zunehmend diffuseres Muster. Solche Veränderungen wurden auch schon bei alten Mäusen (< 18 Monate) beobachtet, jedoch waren unsere Mäuse auch in den letzten Tagen des Experimentes unter 18 Monate alt. Ursache für diese Diffusität könnten auch umweltbedingte Stressoren sein, die wir nicht detektierten, z.B. die urbane Geräuschkulisse, Vibration oder auch Gerüche. Gerade der Geruchssinn ist im Sinnessystem der Mäuse wesentlich bedeutender als die visuelle Sinneswahrnehmung. Wie weit Gerüche einer sich saisonal oder vielleicht auch im Tagesverlauf ändernder Vegetation Einfluss auf die „innere Uhr“ haben, bleibt ungeklärt und bietet Platz für weitere Forschung.

1.2. Zusammenfassung in englischer Sprache

Introduction:

The earth revolves around itself, creating day and night. In the course of evolution, nearly every organism has adapted to this *nycthemeron* and subordinated its metabolism and behavior to it. Throughout the body, a vast range of biological processes such as sleep, cognition, cardiac function, digestion, hormone synthesis, body temperature, and gene expression are rhythmic and differ between day and night. To foresee and fine tune biological functions to specific times within the day or night, circadian clocks have evolved.

In mammals, the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus harbors the core circadian clock, regulating other (peripheral) clocks throughout the body via nervous or humoral pathways. One example is the hormone melatonin, the nightly synthesis which by the pineal gland is under control of the circadian clock. The core clock mechanism which generates these rhythmic changes is a cell autonomous intracellular transcriptional–translational feedback loop which oscillates with a period of approximately 24 h. Under natural conditions, phase and period length of the molecular clockwork are entrained to the environmental day/night cycle.

The circadian rhythms influence our body, determining the timing and rhythms of various physiological and behavioral processes. It is therefore clear that maintaining health and balance is dependent on the correct adaptation to the environment and on the effective synchronization of this information throughout the body. A misalignment can occur when our behavioral and physiological rhythms are forced out of phase with the day/night cycle. An example of this is jet-lag, in which rapid travel across time zones leads to a mismatch between the external day/night cycle and the internal clock, but also between the core and peripheral clocks. Whereas jet lag and its symptoms disappear after a while, a continuous misalignment (chronodisruption) can increase the risk for diabetes, cancer, sleep disorder and other diseases.

An excellent marker for the state and the entrainability of the phasing of the circadian system is the locomotor activity. Putting the motions in relation to time, one may generate actograms making it easier to compare different individuals. In the past, two strains of laboratory mice were often used for these chronobiological studies: the melatonin-proficient C3H and the melatonin-deficient C57Bl/6. However, most experiments have been done under controlled laboratory conditions without incorporation of variability of humidity, temperature, light intensity or the different duration of light exposure in the course of one year. But the daily routine of humans and animals is full of changes and variabilities, and thus, we asked ourselves how the changing abiotic parameters would bear on the mice's behavior. That is why we started our outdoor experiment.

Material and methods:

We used 6 male, adult (10-14 weeks) mice from each of the two strains for our experiment. The mice were kept singly in cages equipped with a hiding box, nesting material, and with food and water *ad libitum* in the back garden of the Dr. Senckenbergische Anatomie in Frankfurt am Main. To protect the mice from predators and rain we built a big cage around the single cages with an acrylic glass roof. In 10-minutes-intervalls, the locomotor activity, the light intensity, the temperature, and the humidity were recorded over a period of 365 days.

We used self-written programs in Microsoft's Excel to process and visualize the mass of data, so that we could analyse the trends of our parameters. To study the locomotion in detail, we separated the whole activity of one day into percentiles. This means that the 20% percentile describes the point of time when the mouse had "accomplished" 20% of the daily locomotion.

The following parameters were extracted for each mouse: [1] the **total daily activity** (counts), [2] timely **positions of the percentiles**, [3] the **daily chronotype** (point of time of the 50% percentile), [4] **stability of the chronotype**, [5] **duration of the (main) activity period** (between 10% -90% percentile), [6] **diurnality indices** (activity in light - activity in dark / total daily activity).

To make the comparison of the strains easier, we „pooled“ the data of the mice of each of the two different strains. For the "pooled" behavioural data of the two strains and for each day we performed correlations of all of the "abiotic" parameters (duration of the dark phase, temperature and humidity data, data on clouds) with all of the behavioral parameters (total activity, duration of the activity period, positions of percentiles, diurnality indices). To detect infra- or ultradian rhythms, we conducted Fourier-analyses.

Results and Discussion:

Under semi-natural conditions, both strains retained their mainly nocturnal locomotory pattern known from the laboratory. The C57Bl mice showed a double peak activity pattern and relatively late chronotype, and the C3H mice showed a single peak pattern and a relatively early chronotype.

In the Fourier-analyses, there was only power in the 1-cycle/day- frequency in both strains. We could not detect any signs for spectral power within the seven day (weekday/weekend) range or rhythmicity within a 30-day (lunar) period. In this context we have to remember that the experiment took place in an urban environment in the light of the street lamps which could cover the moon light and reduce its influence. At the same time, it showed that the mice did not entrain to the human activities in their surroundings which differ between weekdays and weekends. Also, we could not find any correlations between the humidity and all measured activity parameters.

In the correlations of the abiotic parameters we saw that light is the best predictor for the beginning of the activity period. The 20% percentiles are most tightly coupled to the duration of the dark phase in C3H ($r^2=0,79$) and C57Bl ($r^2=0,3$). In the "later" percentiles (50%, 90%) the coupling becomes increasingly weaker in the C3H and even vanishes completely in the C57Bl. The best predictor for the end of duration of activity seems to be the average temperature at night, but there must be further reasons for that.

Focussing on the seasonal variations, we saw that only the C3H regulated their chronotype, its stability, the total daily activity, and the duration of activity. Thus, melatonin might play a role in the seasonal regulation.

There were two phases in the year when the total daily activity in both strains were higher than in the rest of the year. It was the time around the equinoxes. The short switch between light and dark, as well as the relatively rapid change of the timing of dawn and dusk might arouse the mice.

At the end of our experiment, some of the C57Bl lost their typical double peak activity and changed into a more irregular pattern. Such a kind of behaviour has also been found in aged mice (18 months), but the mice we used weren't that old even in the last days of the experiment.

One reason of this change in our mice could be other environmental influences which we did not measure, like background noise, vibration or different smells. Indeed, in mice, the olfaction is a much more essential sense than their ability to see. Perhaps there are variable odors of vegetation, changing seasonally or changing in the course of the day, which might have an influence on the 'circadian clock' of the mice. Answers might be found in experiments with the focus on the olfactory sense.

1.3. Übergreifende Zusammenfassung in Deutsch

Einleitung:

Jeder kennt das Gefühl, von Terminen durch den Alltag getrieben zu werden und gesetzte Zeiten einhalten zu müssen. Bereits vom Kindesalter an werden wir sozialisiert, zu gewissen Uhrzeiten aufzustehen, pünktlich zur Schule zu gehen oder Abgabefristen einzuhalten. Also strukturieren die meisten Menschen ihren Tag unter ständigem Blick auf die Uhr. Lässt man sich aber auf ein gedankliches Experiment ein und entledigt sich seiner Uhr, wird es einem trotzdem nicht schwerfallen, gewisse Zeiten einzuhalten oder eine Stunde abzuschätzen. An sonnigen Tagen vermag manch einer durch die Position der Sonne eine Uhrzeit abzulesen, aber letztendlich bleibt lediglich ein inneres Gefühl, mit dem man den Morgen vom Nachmittag unterscheiden kann. Entkoppelt man sich also von den Uhrzeiten, bleibt nur die Orientierung am Sonnenstand mit ihrem Auf- und Untergang. Dieser wiederkehrende Wechsel von Tag und Nacht, verursacht durch das Drehen der Erde um die eigene Achse in 24 Stunden, dient vielen Lebewesen und auch dem Menschen als ein sogenannter „siderischer“ Zeitgeber. Im Laufe der Evolution haben sich Lebewesen an dieses Nycthemeron angepasst, sodass sich Stoffwechselzyklen, der Schlaf/Wach-Rhythmus und viele andere Körperfunktionen an dem Wechsel von Licht und Dunkelheit ausrichten. Solch ein Rhythmus kann auch als „diurnal“ bezeichnet werden.

Geht man nun eine Stufe weiter und koppelt man die Lebewesen von den äußeren/sideralen Zeitgebern¹ ab, wird man beobachten, dass sich gewisse Prozesse innerhalb von ungefähr 24 Stunden weiterhin wiederholen. Ein solcher annähernd einen Tag andauernder Rhythmus wird als „circadian“ (circa (lat.= ungefähr), dies (lat.= Tag)) bezeichnet. Verantwortlich hierfür ist das hierarchisch aufgebaute circadiane System, das sicherstellt, dass Körperfunktionen und Stoffwechselprozesse synchronisiert und somit effektiv ablaufen können. Das circadiane System besteht darüber hinaus aus vielen endogenen oszillierenden Systemen („periphere Uhren“),^{2,3} die in nahezu allen Zellen vorhanden sind und einem zentralen Zeitgeber, der „zentralen inneren Uhr“. Die „zentrale innere Uhr“ steuert über verschiedene Ausgangswege die peripheren Uhrwerke in allen Organen und beeinflusst so den Stoffwechsel und das Verhalten.

Bei Menschen und Säugetieren ist die „zentrale innere Uhr“ im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) lokalisiert. In den Zellen des - wie sein Name bereits verrät - oberhalb des Chiasma opticum im Hypothalamus aufzufindenden SCN läuft eine transkriptionelle und translationelle negative Rückkopplungsschleife, die eine Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden hat. Wesentliche Transkriptionsfaktoren sind hier CLOCK, BMAL, PER und CRY, welche wiederum die Produkte der gleichnamigen „Uhrengene“ sind.^{4,5} Die einzelnen Phasen dieser Rückkopplungsschleife werden durch Lichteinwirkung an den äußeren Tag/Nacht Rhythmus, mithin also an den astrophysikalischen Tag (Photoperiode) angepasst. Melanopsin-haltige, photosensitive Ganglienzellen in der Retina wandeln die Lichtinformation in elektrische Impulse um, leiten sie über den Nervus opticus an den SCN und steuern so die Expressionsaktivität der oben genannten Uhrengene. Diese Anpassung der inneren Uhr an die äußere Zeit nennt man Entrainment.⁶

Der SCN steuert über verschiedene Ausgangswege periphere Uhrwerke, wodurch die Synchronisation der Organe und Zellen des Körpers erfolgt. Zum einen kommt es zu einer neuronalen Signalweiterleitung über Axone des autonomen Nervensystems und zum anderen geschieht diese Signaltransduktion humoral. Ein wichtiger Effektor des circadianen Systems ist das Hormon Melatonin, dessen nächtliche Synthese und Freisetzung im Pinealorgan von SCN gesteuert wird. Zu Beginn der Nacht inhibieren GABAerge Neuronen im SCN den paraventriculären Hypothalamuskern, wodurch es dort zu einer Signalweiterleitung über die Nerven des Nucleus intermediolateralis auf das Ganglion cervicale superior des sympathischen Grenzstrangs kommt. Die postganglionäre Axone leiten dann das

Signal an die Glandula pinealis, wo Melatonin aus Serotonin synthetisiert und in die Blutbahn ausgeschüttet wird.⁷ Diese Kaskade kann jedoch von nächtlicher Beleuchtung unterdrückt werden und somit die Melatonin-Sekretion stören.

Melatonin-Rezeptoren wurden an u.a. im Gehirn, auf der Retina, am interventrikularen Septum, in der Aorta, in der Leber, im Pankreas, in den Nieren, im Darm in der Haut und in Immunzellen nachgewiesen. Dabei gibt es eine Vielzahl von Rezeptortypen mit verschiedenen Funktionen, wodurch Melatonin beispielsweise direkt Einfluss auf die Genexpression nehmen kann.⁸

Melatonin wird therapeutisch zur Anpassung des Schlaf-Wach-Rhythmus und Störungen des zirkadianen Systems, wie sie beispielsweise nach einem Flug über mehrere Zeitzonen auftreten (Jetlag), aber auch bei Schichtarbeit, Blindheit oder Schlafstörungen eingesetzt. Die beklagten Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens resultieren vor allem, weil die gewohnte Schlafenszeit (Innenzeit) nicht mehr mit der Nachtzeit (Außenzeit) übereinstimmt. Sind die innere Uhr und somit die unterschiedlichen Körperfunktionen dauerhaft nicht optimal an die äußeren Zeitgeber angepasst, spricht man von einer Chronodisruption. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die Chronodisruption eine wesentliche Ursache für Schlafstörungen, Stimmungsschwankungen, Appetitlosigkeit, eine allgemein verminderte Leistungsfähigkeit, Diabetes mellitus Typ II und weitere chronische Erkrankungen darstellt.⁹⁻¹² Die „International Agency for Research on Cancer (IARC)“ geht noch einen Schritt weiter und klassifizierte im Jahr 2007 Schichtarbeit, die zur Chronodisruption führt, als potentiell karzinogen.¹³

Bei aller Konstanz der molekularen Grundlagen und Mechanismen weist das circadiane System interindividuelle Unterschiede auf, die zur Unterscheidung verschiedener Chronotypen geführt haben (Spättyp/Eule, Frühtyp/Lerche)^{14,15} die ihr Verhalten gegenüber äußeren Zeitgebern unterschiedlich justieren. Untersuchungen bei Menschen haben gezeigt, dass späte Chronotypen einem sogenannten Social Jet lag zwischen Arbeitstagen und freien Tagen unterliegen und eine erhöhte Morbidität, Suchtanfälligkeit und eine Tendenz zur Fragmentierung der circadianen Rhythmen aufweisen.^{16,14}

Zudem kann man zugespitzt postulieren, dass wir durch künstliche Beleuchtung die natürlichen Zeitgeber in den Hintergrund gedrängt haben und sich unsere westliche 24/7-Gesellschaft von den sideralen Zeitgebern abgekoppelt hat.

Da aber das circadiane System eine wichtige Rolle für Gesundheit und Wohlbefinden spielt, sind Untersuchungen über die Mechanismen, die das circadiane System beeinflussen, weiterhin notwendig. Diese werden zusammengefasst unter dem Begriff der chronobiologischen Forschung. Die Chronobiologie widmet sich dem Zusammenspiel aus den verschiedenen abiotischen (Zeit, Temperatur, etc.) bzw. biotischen (Nahrungsaufnahme, soziale Interaktion, etc.) Faktoren mit der zeitlichen Organisation physiologischer und biochemischer Mechanismen in Lebewesen.

Wesentliche Einschränkungen der bisherigen chronobiologischen Analysen ergeben sich dadurch, dass sie meistens im Labor unter konstanten Bedingungen stattfinden.¹⁷⁻²² Aber weder Menschen noch Mäuse leben unter kontrollierten Laborbedingungen; sie sind einer sich stets verändernden Umwelt ausgesetzt. Unsere Versuche im „Freien“ werden sich daher auf den Einfluss alltägliche abiotischer Zeitgeber - also Licht, Luft, Sonne, Wind, Geräusch – und des melatoninergen Systems auf das lokomotorische Verhalten als biorhythmischen „read out“ konzentrieren - denn der Wechsel, das tatsächliche Zusammenspiel dieser abiotischen und endogenen Faktoren lässt sich im Labor nicht simulieren.

Weil solche mechanistischen Untersuchungen am Menschen nur schwer durchzuführen sind, bevorzugt man in der chronobiologischen Forschung Labormäuse, die genetisch homogen und einfach

zu halten sind. In der Vergangenheit haben sich vor allem zwei Mäusestämme zur Untersuchung des circadianen Rhythmus bewährt. Diese Mäusestämme, zeichnen sich durch angeborene Mutationen aus. Der C3H Stamm (C3H/HeN-Pde6brd1) erkrankt bereits im frühen Alter an einer Retinadegeneration mit dem Verlust aller Stäbchen und Zapfen, wobei aber die photosensitiven Ganglionzellen, als diejenigen Rezeptoren, die für das Entrainment des circadianen Systems zuständig sind (s.o.), erhalten bleiben. Die C3H Mäuse sind daher blind, können aber weiterhin die innere Uhr im SCN mit der Lichtinformation versorgen und Melatonin synthetisieren bzw. freisetzen.^{23,24} Der C57Bl Stamm (C57Black/6J) ist zwar im Besitz der vollen Sehkraft, hat aber eine Mutation auf einem Gen, das für die Expression eines an der Melatoninsynthese beteiligten Enzyms (AANAT) verantwortlich ist. Sie sind nicht mehr zur rhythmischen Melatoninsynthese fähig und werden daher als Melatonin-defizient bezeichnet.²⁵ Dennoch besitzen sie endogene Rhythmen und können durch Licht „entrained“ werden.^{19,26}

Um die Auswirkungen des Entrainments auf das circadiane System registrieren zu können, nutzt man die offensichtlichste, am leichtesten zumessende rhythmische Lebensäußerung: das Lokomotionsverhalten.^{27,28} Unter den normalen Laborbedingungen sind beide Mausstämme nachtaktiv, doch unterscheiden sie sich in Hinsicht auf ihre Aktivitätsprofile und die Phasenlage ihrer Aktivität: die C3H Mäuse erreichen gleich nach dem Beginn der Dunkelphase ein hohes Aktivitätsniveau, das dann im Laufe der Nacht stetig absinkt (monophasisch). Zudem haben sie einen frühen Chronotyp. Die C57Bl Mäuse hingegen zeigen zum Ende der Dunkelphase hin noch einen zweiten Aktivitätsgipfel (biphasisch) und haben einen späten Chronotyp.^{15,22}

Wie oben bereits erwähnt basiert ein Großteil des chronobiologischen Wissen hauptsächlich auf Daten, die im Labor unter strikt kontrollierten und standardisierten Bedingungen erhoben worden sind. Hierzu wurden die Mäuse bei einer Umgebungstemperatur von 20°C, gleichbleibender Luftfeuchtigkeit, einer Beleuchtungsperiode (mit abruptem Lichtwechsel) von 12 Stunden Licht/12 Stunden Dunkelheit und mit Futter und Wasser ad libitum gehalten.^{17,21,22} Diese Laborbedingungen finden sich in der Natur jedoch nicht. Die Temperaturen schwanken im Tagesverlauf, die Luftfeuchte variiert, die Tage können trübe oder hell sein, mit den Jahreszeiten - zumindest in den gemäßigten Breiten - ändern sich die Dauer der Lichtperiode und endlich geht das Licht auch nicht, wie im Labor, "an" oder "aus". Es gibt eine Dämmerung, wobei die Länge der Dämmerung auch jahreszeitabhängig ist. Uns interessierte, wie sich diese variablen physikalischen, abiotischen Faktoren auf das Verhalten der beiden Mausstämme auswirken - weswegen wir "ins Freie" gingen.

Das Ziel dieser Außenversuche ist es nicht, eine vollständige Isolation der Einzelparameter zu gewährleisten, sondern zunächst einmal eine - durchaus quantifizierte - Vorstellung davon zu erlangen, welche im Labor beobachteten "Regeln" und Unterschiede zwischen den Mausstämmen (bzw. zwischen den Individuen) sich unter weniger kontrollierten Bedingungen wiederfinden und welche nicht. Darüber hinaus interessierten uns die Verhaltensregulation der Mäuse im Verlauf des gesamten Jahres hinsichtlich der saisonalen/jahreszeitlichen variierenden Bedingungen. Eine weitere interessante Frage, die durch diese Untersuchungen angegangen werden kann, ist, wieweit der kulturelle Einfluss der menschlichen Aktivitäten unter diesen Bedingungen das tierische Verhalten beeinflusst - werden die Mäuse sich an den Rhythmus von Wochen und Arbeitstagen ankoppeln?

Material und Methoden:

Jeweils 6 männliche, erwachsene (10-14 Wochen) Mäuse beider Stämme wurden in Einzelkäfigen, die mit einer kleinen Nistbox und Nistmaterial bestückt waren, im Garten des Dr. Senckenbergischen Institutes für Anatomie positioniert. Futter und Wasser wurde ad libitum bereitgestellt. Um die Mäuse vor Regen und vor Fressfeinden zu schützen, wurden die Einzelkäfige in einen lichtdurchlässigen, bedachten, größeren Käfig gestellt. Die Käfige wurden jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten einmal pro Woche gereinigt.

In 10-Minuten-Intervallen wurden die Aktivität jeder einzelnen Maus, die Lichtintensität, die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit aufgenommen. Die Messungen wurden über insgesamt 365 Tage im Jahr 2017 durchgeführt. Um die Tiere an die Außentemperaturen im „Freiland“ zu gewöhnen, wurden sie zunächst übergangsweise für 3 Wochen in einen ungeheizten Raum (ca. 12° C) gehalten, bevor wir sie endgültig in den Garten brachten. Dieser unkonventionelle Versuch wurde vom Regierungspräsidium Darmstadt geprüft und genehmigt.

Die einjährige Registrierung der oben genannten Messparameter in 10 Minuten Intervallen bei 12 Mäusen erzeugte mehrere Millionen Datenpunkte. Zur Verarbeitung und Visualisierung dieser Rohdaten benutzen wir ein selbstgeschriebenes Programm auf Basis von Microsoft's Excel, wodurch einzelne Verläufe von Licht, Feuchtigkeit, Temperatur und Aktivität analysiert werden konnten.

Die Rohdaten der abiotischen Parameter wurden wie folgt behandelt: (1) aus den Daten der Photosensoren wurde die Zeitpunkte [MEZ] des Sonnenaufganges und des Endes der Abenddämmerung ermittelt. Aus diesen Zeitpunkten wurde die Länge der Dunkelphase errechnet. (2) Die Tagesdurchschnittstemperatur wurde ermittelt und in Bezug auf die Lichtdaten wurde auch die Durchschnittstemperatur in der jeweiligen Licht- bzw. Dunkelphase ermittelt. (3) Mit den Daten zur Luftfeuchtigkeit wurde ebenso verfahren.

Zur detaillierteren Untersuchung der lokomotorischen Aktivität in Abhängigkeit der abiotischen Faktoren, unterteilten wir die Gesamtaktivität im jeweiligen Nycthemeron in Perzentilen (10%/20%/30% usw. bis 90%) und bestimmten die Zeitpunkte [MEZ] deren jeweiligen Auftretens.. Ein Perzentil beschreibt den Zeitpunkt, an dem ein gewisser Prozentsatz der Gesamtaktivität abgeleistet wurde; das 20% Perzentil definiert also den Zeitpunkt, an dem 20% der Gesamtaktivität erbracht worden ist. Aus den Daten wurden folgende Parameter für jede Maus extrahiert: (1) die Gesamtaktivität im jeweiligen Nycthemeron, (2) die Zeitpunkte [MEZ] der Perzentile, (3) der tägliche Chronotyp (der Zeitpunkt des Auftretens des 50% Perzentils), (4) die Dauer der Aktivitätsphase (=Zeitraum in [h] zwischen dem Auftreten des 10% und des 90% -Perzentils), (5) Diurnitätsindex (Aktivität in der Lichtphase - Aktivität in der Dunkelphase/Tagesgesamtaktivität).

Die so gewonnenen Daten wurden folgendermaßen weiter analysiert: (1) aus den täglichen Daten zum Chronotyp jedes Einzeltieres wurde dessen zeitliche Stabilität ermittelt, indem der IQR (Interquartilbereich) des Chronotyps über 30 Tage hinweg errechnet wurde. (2) Um eine erste Übersicht über die Unterschiede zwischen den Stämmen zu gewinnen, wurden die Daten zum Chronotyp, dessen Stabilität, der täglichen Gesamtaktivität, der Diurnalität und zur Länge der Aktivitätsphase jeder der je 6 Mäuse eines Stammes über den gesamten Beobachtungszeitraum gemittelt und diese Mittelwerte zwischen den Stämmen statistisch (Mann-Whitney U-Test) verglichen.

Die saisonalen Veränderungen wurden nach dem folgendem statistischem Schema untersucht:

(1) Die täglichen Messwerte der verschiedenen Aktivitätsparameter der jeweils 6 Mäuse eines Stammes wurden gemittelt. (2) Auf der Basis dieser (365) Mittelwerte wurden gleitende multiple t-Tests (Bonferroni-korrigiert) durchgeführt, die die Werte von 30-Tage Intervallen mit denen des ganzen Jahres verglichen, um statistisch signifikante Veränderungen zu detektieren.

Für die Korrelationsanalysen (Aktivitätsparameter vs. Licht-, Temperatur und Feuchtigkeitsdaten) wurden einfache parametrische lineare Pearson-Korrelationen verwendet. Die Fourier-Analysen zur Ermittlung von Frequenzen und Periodizitäten in den Aktivitätsdaten wurden mit Hilfe eines Internetbasierten Fourier-Analysators durchgeführt.

Ergebnisse:

Alle Tiere überlebten den Aufenthalt im Freien ohne erkennbare gesundheitliche Beeinträchtigungen. Überraschenderweise behielten die beiden Mausstämme (fast, s.u.) während der gesamten Zeit im Freien ihre jeweils typischen Aktivitätsmerkmale, die aus dem Labor bekannt sind: alle Tiere waren überwiegend nocturnal, die C3H Mäuse zeigten monophasische Aktivitätsprofile und einen frühen Chronotyp, die C57Bl Mäuse einen späteren Chronotyp und zwei Aktivitätsgipfel (biphasisch). Im Unterschied zum Labor waren in unserem Experiment die C3H Mäuse wesentlich aktiver als die C57Bl Mäuse.

In der Fourier-Analyse konnte nur ein 24 Stunden (diurnaler) Rhythmus in beiden Stämmen nachgewiesen werden. Andere (lunare, wöchentliche oder weniger als tageslange Rhythmen) konnten nicht detektiert werden.

Die Korrelationsanalysen der abiotischen Daten zeigten, dass die im Jahresgang sich ändernden Lichtverhältnisse die bei weitem besten Prädiktoren für den Beginn der allnächtlichen Aktivitätsphasen sind. Die Zeitpunkte des Auftretens der frühen (10%/20%) Perzentile waren bei den C3H Mäusen stark ($r^2=0,7$), bei den C57Bl Mäusen moderat ($r^2=0,3$) mit der Dauer der Licht- bzw. Dunkelphase verknüpft. Die "späteren" Perzentile zeigten deutlich schwächere oder gar gänzlich fehlende Korrelationen mit den Lichtdaten. Die Dauer der Licht- bzw. Dunkelphase korrelierte bei den C57Bl Mäusen nicht mit der täglichen Gesamtaktivität, bei den C3H Mäusen fanden wir eine moderate ($r^2=0,3$) Korrelation. Die Dauer der Aktivitätsphase korrelierte in beiden Stämmen nur moderat oder schwach mit der Dauer der Licht- bzw. Dunkelphase. Die nächtliche Durchschnittstemperatur hingegen war in beiden Stämmen der bessere Prädiktor für diesen Aktivitätsparameter. So verlängerte sich die Dauer der Aktivitätsphase in kalten Nächten und verkürzte sich in warmen Nächten (C3H $r^2=0,6$; C57Bl $r^2=0,4$). Bei den C57Bl Mäusen hatte die Temperatur keinerlei Vorhersagekraft bezüglich der täglichen Gesamtaktivität, bei den C3H Mäusen bestand nur ein schwacher ($r^2=0,2$) Zusammenhang. Es gab keine Zusammenhänge zwischen der Luftfeuchte und irgendwelchen Aktivitätsparametern.

Die Analyse der saisonalen Veränderungen zeigte, dass die C3H Mäuse ihren Chronotyp, dessen Stabilität, die tägliche Gesamtaktivität und die Dauer ihrer Aktivitätsphase saisonal (und statistisch hochsignifikant) regulieren. Diese saisonale Regulation war bei den C57Bl Mäusen deutlich schwächer ausgeprägt und in Hinsicht auf Chronotyp oder Rhythmusstabilität nicht vorhanden.

Im Jahresgang konnten wir 2 Phasen detektieren, in denen beide Stämme eine gesteigerte tägliche Gesamtaktivität zeigten. Diese Phasen traten jeweils um die Tag- und Nachtgleichen (Äquinoktien) herum im Frühjahr und im Herbst auf, wobei ein größerer Anstieg der Gesamtaktivität im Herbst zu sehen war. In unseren Daten korrelierte diese erhöhte Aktivität mit keinen anderen Parametern oder anderen ungewöhnlichen Beobachtungen. Während beider Phasen lag die Tagesdurchschnittstemperatur zwischen 10 und 15°C.

Zum Ende des Experimentes, in den letzten beiden Monaten, verloren einige der C57Bl Mäuse das für sie typische biphasische Aktivitätsprofil, doch behielten sie ihr nocturnales Verhalten bei.

Diskussion:

Obwohl in unserem Experiment eine Vielzahl von Variablen vorherrschten und es sowohl zu täglichen, wie auch zu saisonalen Schwankungen der abiotischen Einflüsse kam, behielten beide Mäusestämme ihren „chronobiologischen Fingerabdruck“, den wir aus dem Labor kennen, bei. Das Fehlen von einer 7-Tage-Frequenz in der Fourier-Analyse zeigt, dass die Mäuse nicht im Sinne eines Wochenrhythmus von menschlichen Aktivitäten in ihrer Umgebung beeinflusst werden. Weder das wöchentliche Reinigen, noch die Auswirkungen von Werktagen oder Wochenende manifestierten sich in den Aktivitätsparametern der Mäuse. Auch das in 30-Tage-Intervallen variierende Mondlicht zeigte keinen Einfluss auf die Aktivitätsparameter der Mäuse, obwohl dies in anderen Versuchen beschrieben wurde.²⁹ Allerdings wurde unser Experiment in einer Großstadt durchgeführt. Die nächtliche Beleuchtung durch Straßenlaternen und dessen Streulicht könnten den Effekt des Mondlichtes wohlmöglich maskiert haben.

Die im Jahresgang sich ändernde Beleuchtungsdauer war der potenteste abiotische Einflussfaktor auf die Aktivitätsparameter. Die Dauer der Licht- bzw. Dunkelphase ist ein guter Prädiktor für das „Timing“ der frühen Perzentile (10%, 20%), die bei den nocturalen Mäusen zeitlich nahe dem Einbruch der Dunkelheit oder kurz danach auftreten. Die späten Perzentile werden bei den C3H Mäusen nur wenig, die den C57Bl Mäusen gar nicht von der Dauer der Licht- bzw. Dunkelphase beeinflusst. Es ist also im Wesentlichen der Eintritt der Dämmerung - und weniger das Grauen des Morgens - welches das Entrainment gewährleistet. So zeigte sich bereits in vorherigen Experimenten, dass Licht die elektrische Aktivität im SCN von Nagetieren hemmt. Die fehlende Hemmung und die dadurch verstärkte Aktivität des SCN könnte den Aktivitätsanstieg der Mäuse begründen.

Wir fanden jedoch keine Korrelation zwischen klaren, sonnigen oder dunklen, verregneten Tagen und den Aktivitätsparametern. Es scheint also, dass es einen unteren Grenzwert gibt, ab dem die photosensitiven Ganglienzellen in der Retina aktiviert werden und eine stärkere Lichtintensität keinen Einfluss auf deren Aktivität hat. Die genaue Definition des unteren Grenzwertes bleibt offen, aber es ist davon auszugehen, dass er über dem nächtlichen Streulicht bzw. dem Mondlicht liegt. Andersfalls hätte man eine lunare Rhythmik in den Parametern erkennen müssen.

Die stärkste Korrelation unter allen von uns gemessenen Parametern zu der Aktivitätsdauer zeigte die Temperatur; vor allem die nächtliche Durchschnittstemperatur. Offen bleibt jedoch die Frage, welche weiteren unentdeckten Stimuli hauptsächlich zum Ende der Aktivitätsphase beitragen. Hier könnte man insbesondere den Blick auf endogene Oszillatoren richten.

Daan et al. konnte in einer Feldstudie³⁰ nachweisen, dass Mäuse unter seminaturalen Bedingungen in den Sommermonaten vermehrte Aktivität in der Lichtphase zeigten. Dieses vermehrte tagaktive Verhalten³¹ im Sommer konnte in unserem Versuch nicht beobachtet werden. Allerdings war der Aufbau seines Experimentes ein völlig anderer. In seinem Versuch wurden die Tiere u.a. einer Nahrungskonkurrenz ausgesetzt. Aus anderen Studien ist ebenfalls bekannt, dass ein negativer Energiehaushalt in Mäusen zu einem veränderten Aktivitätsprofil führen kann.³²⁻³⁵ Zudem wurden in seinem Versuch auch weibliche Tiere gehalten, die im Falle einer Schwangerschaft einen erhöhten Nahrungsbedarf haben. Diese könnte die bei Daan et al. die beschriebenen Änderungen im Aktivitätsprofil erklären. Durch unsere Haltung der männlichen Tiere in Einzelkäfigen bei Futter und Wasser ad libitum können wir solche Beeinflussungen ausschließen.

Im Vergleich der Gesamtaktivität beider Stämme unter Laborbedingungen wird man keinen wesentlichen Unterschied feststellen.^{17,22} Legt man jedoch die Gesamtaktivität aus den „Freiland-Experiment“ der beiden Stämme nebeneinander wird man feststellen, dass die C3H Mäuse aktiver als

die C57BL Mäuse waren. Vor allem in warmen, kurzen Nächten zeigten die C3H Mäuse vermehrte Lokomotion auf, was die Bedeutung der Temperatur als Prädiktor unterstreicht.^{36,37}

Ein wichtiges Ergebnis, welches unser Experiment erbrachte, ist die Saisonalität der verschiedenen Mausstämmen. Die C3H Mäuse passen sich den jahreszeitlichen Umweltveränderungen an, während die C57BL Mäuse weitgehend unbeeinflusst von äußeren Veränderungen ihrem „eigenem“ Rhythmus folgen. Der Grund für diese Saisonalität, das heißt die Anpassung des Lokomotionsverhaltens an die veränderten Lichtverhältnisse, könnte die Wirkung von Melatonin sein. Wie oben bereits beschrieben, ist der C3H Stamm fähig, über Melatonin die einzelnen Oszillatoren in den Zellen anzusteuern und die Einflüsse aus der Umwelt in die eigenen Stoffwechselprozesse einzuarbeiten.³⁸ Im Kontrast dazu stehen die Melatonin-defizienten C57BL Mäuse, welchen keine hormonelle Synchronisierung mittels Melatonin zur Verfügung steht und dadurch womöglich auch keine saisonale Anpassung des Aktivitätsverhaltens nachweisen können. In Jet-Lag Experimenten konnte bereits beobachtet werden, dass die C57BL Mäuse eine stark verzögerte Anpassung im Vergleich zu den C3H Mäusen aufwiesen.^{21,26,27} Unser Versuch bestätigt diese Aussagen.

Die fehlende Saisonalität bedeutet aber auch, dass die C57BL Mäuse einen höheren Grad an Autonomie gegenüber den abiotischen Zeitgebern besitzen. Wenn man dies in Bezug zu den oben genannten Fakten bringt, könnte es aber auch bedeuten, dass die C57BL Mäuse unter einer dauerhaften Chronodisruption leiden.

Am Ende des Versuchs verloren einige C57BL Mäuse ihr bekanntes biphasisches Aktivitätsmuster und wechselten in ein zunehmend diffuseres Muster. Solche Veränderungen der Aktivitätsmuster sind auch bei alten (18 Monate) Mäusen zu sehen,^{39–41} jedoch waren die hier verwendeten Mäuse auch in den letzten Tagen des Experimentes unter 18 Monate alt. Führt also eine chronische Chronodisruption zu den Variationen des Chronotyps? Im Vergleich dazu zeigten die Mäuse aus dem C3H Stamm keine Veränderungen ihres Aktivitätsrhythmus während des gesamten Versuches. Spielt also Melatonin eine Rolle in der Rhythmusstabilität und hat diese einen Einfluss auf den Alterungsprozess? Wenn die C57BL Mäuse sich weniger von den abiotischen Faktoren beeinflussen lassen, müssten sie dann nicht eine höhere Rhythmusstabilität aufweisen?

Man sollte weiter nicht außer Acht lassen, dass die Mäuse in unserem Experiment vielleicht weiteren möglichen Stressoren ausgesetzt waren, die wir nicht gemessen haben. Hier kommen beispielsweise die urbane Geräuschkulisse, Vibration oder auch Gerüche in Betracht. Gerade der Geruchssinn ist im Sinnessystem der Mäuse wesentlich bedeutender als die visuelle Sinneswahrnehmung. Wie weit Gerüche einerseits saisonal oder vielleicht auch im Tagesverlauf ändernder Vegetation Einfluss auf die „innere Uhr“ haben, bleibt ungeklärt und bietet Platz für weitere Forschung.

Rätselhaft bleibt die verstärkte Aktivität beider Stämme während der Wochen um die Tag-Nacht-Gleiche, die beobachtet werden konnten. Beide Mausstämmen zeigten in diesen Phasen eine gesteigerte, relativ unregelmäßige Gesamtaktivität. Die aufgezeichneten Parameter, Temperatur oder Luftfeuchtigkeit, bieten keine Korrelation dazu. Durch die rasche Änderung der Lichtverhältnisse und die schnellere tägliche Verschiebung der Dämmerungszeitpunkte in den Wochen um die Äquinoktien herum, wird das circadiane System relativ rasch in der Zeit sich verschiebenden Stimuli des Entrainments ausgesetzt. Dies scheint zu dem o.g. „arousal“, zu dieser „Aufregung“, zu führen.

Aufgrund der Beobachtungen, dass beide Mausstämmen zu den Zeiten der Äquinoktien erregt waren und im Vergleich zu der sonst gemessenen Aktivität von der Norm abweichen, sollte man sich die Frage stellen, ob die regulären/standardisierten Bedingungen (12:12 Hell/Dunkel), ohne einen Übergang im Sinne einer Dämmerung, zu denen die meisten Labormäuse gehalten werden, einer physiologischen Haltung entspricht. Wären die Resultate von in der Vergangenheit durchgeführten Experimenten

reproduzierbar, wenn die Mäuse nicht mehr in einem Zustand der ständigen Erregung befänden? Adaptieren sich die beiden Stämme an den oben genannten Zustand, wenn sie lange genug diesen Bedingungen ausgesetzt werden? Diese und noch weitere Fragen wie z.B. der olfaktorische Einfluss auf das circadiane System von Mäusen gilt es in der Zukunft zu klären.

2. Publikation

Seasonal Variations of Locomotor Activity Rhythms in Melatonin-Proficient and -Deficient Mice under Seminatural Outdoor Conditions

Joshua Metzger*, Helmut Wicht*, Horst-Werner Korf† and Martina Pfeffer‡

**Dr. Senckenbergische Anatomie II, Fachbereich Medizin, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany,* †*Institut für Anatomie I, Fachbereich Medizin, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Germany,*

‡*Institut für Anatomie II, Fachbereich Medizin, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Germany*

Abstract Locomotor activity patterns of laboratory mice are widely used to analyze circadian mechanisms, but most investigations have been performed under standardized laboratory conditions. Outdoors, animals are exposed to daily changes in photoperiod and other abiotic cues that might influence their circadian system. To investigate how the locomotor activity patterns under outdoor conditions compare to controlled laboratory conditions, we placed 2 laboratory mouse strains (melatonin-deficient C57Bl and melatonin-proficient C3H) in the garden of the Dr. Senckenbergische Anatomie in Frankfurt am Main. The mice were kept singly in cages equipped with an infrared locomotion detector, a hiding box, nesting material, and with food and water ad libitum. The locomotor activity of each mouse was recorded for 1 year, together with data on ambient temperature, light, and humidity. Chronotype, chronotype stability, total daily activity, duration of the activity period, and daily diurnality indices were determined from the actograms. C3H mice showed clear seasonal differences in the chronotype, its stability, the total daily activity, and the duration of the activity period. These pronounced seasonal differences were not observed in the C57Bl. In both strains, the onset of the main activity period was mainly determined by the evening dusk, whereas the offset was influenced by the ambient temperature. The actograms did not reveal infra-, ultradian, or lunar rhythms or a weekday/weekend pattern. Under outdoor conditions, the 2 strains retained their nocturnal locomotor identity as observed in the laboratory. Our results indicate that the chronotype displays a seasonal plasticity that may depend on the melatonergic system. Photoperiod and ambient temperature are the most potent abiotic entraining cues. The timing of the evening dusk mainly affects the onset of the activity period; the ambient temperature during this period influences the latter's duration. Humidity, overall light intensities, and human activities do not affect the locomotor behavior.

Keywords chronotype, actography, circadian rhythms, outdoor condition, seasonal variations

1. To whom all correspondence should be addressed: Martina Pfeffer, Institut für Anatomie II, Heinrich Heine Universität, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany; e-mail: Martina.Pfeffer@med.uni-duesseldorf.de.

Circadian rhythms such as sleep/wake cycles, body temperature, and hormone secretion are endogenous physiological oscillations that occur within a period of approximately 24 h and persist even in the absence of rhythmic environmental cues. In mammals, these rhythms are driven by the circadian clock located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus (Korf and von Gall, 2012). Many aspects of the environment vary with time of day or season, and the circadian system is influenced by environmental stimuli (so-called “zeitgebers”; Aschoff, 1954) that are able to phase shift (“entrain”) the endogenous clock, pushing it forward or backward, in order to adapt to changes in the outside world (Korf and von Gall, 2012). A common readout of the phasing of the circadian system is the locomotor activity that can be shifted back and forth in time by the different entraining clues (Mrosovsky, 1996; Pfeffer et al., 2012; van Oosterhout et al., 2012; von Gall et al., 1998; Wicht et al., 2014). Furthermore, the locomotor activity can be considered an excellent marker for the state and the entrainability of the circadian system (Pfeffer et al., 2012; van Oosterhout et al., 2012; Wicht et al., 2014).

Much of our knowledge of the circadian system and its entrainment (i.e., the responses to abiotic cues such as light or temperature, as well as masking effects, entrainment, chronotype, and rhythm stability) have been studied almost exclusively in the laboratory under standardized conditions (Homola et al., 2015; Mrosovsky, 1996; Pfeffer et al., 2012; Refinetti, 2002; Refinetti, 2004; von Gall et al., 1998; Wicht et al., 2014).

Our study was performed under seminatural outdoor conditions and focused on the impact of seasonal changes in the photoperiod and other abiotic physical stimuli. All of these parameters differ greatly from the standard situation in the laboratory. In the laboratory, the temperature is typically set to about 20 °C, and the photoperiod is set to 12 h light/12 h darkness. This particular condition never occurs outdoors, not even around the time of the equinoxes, because, at least in central Europe, an average daily temperature of 20 °C would not be reached on these days. Instead, there are relatively unpredictable daily combinations of rising and falling temperatures, humidity, and illumination conditions. In the laboratory, light is turned “on” or “off” abruptly, whereas outdoors, twilight, which is defined by the angles of the sun below the horizon, accompanies the dawn-dusk transitions. In addition, under natural conditions, environmental variables do not follow stable cycles (i.e., the temperature might drop during the day with clouds or humidity changes with rainfall). Furthermore, in the laboratory, photic and nonphotic cues are kept constant or are altered independently, whereas under natural conditions, they

are not independent; for example, in the laboratory, the temperature is kept constant, whereas outside, the temperature is usually higher during the light phase. Therefore, we expanded beyond the standard 12 h light/12 h dark regimes at room temperature in the laboratory to assess how the circadian system operates under more natural conditions, where a lot of potential time cues are often simultaneously acting on it.

Toward this end, we put laboratory mice (melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57Bl) outdoors, into the back garden of the Dr. Senckenbergische Anatomie in Frankfurt am Main (at approximately 50°, 5' N; 8°, 39' E) and monitored their locomotor activity individually for a period of 1 year (365 days). The mice were housed in single cages and were thus protected from predatory pressure, competitive and reproductive stresses, and bodily interactions with other mice, and they were given food and water ad libitum. Owing to the particular setting in the back garden, the mice were also exposed to a variety of other cues, such as natural and human noises and different natural odors, which might stem from predators or wild mice; they had potential contact with insects, germs, and parasites; and they were exposed to a number of parameters that we, of course, could not control. We studied how natural abiotic factors act on the activity patterns of these 2 standard laboratory mouse strains (C3H and C57Bl) compared with the locomotor patterns observed in the lab.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments with animals reported in this article were conducted in accordance with the policy on the use of animals in neuroscience research and the policy on ethics as approved by the Society for Neuroscience and by the European Communities Council Directive (89/609 EEC) and by the Regierungspräsidium Darmstadt (Gen. Nr. FU/1138).

We used 6 adult (10–14 weeks old) male mice of either C57Black/6J (C57Bl; body weight range 27.3–28.9 g) or C3H/HeN-Pde6brd1 (C3H; body weight range 31.1–34.8 g). Animals were obtained from Charles River Europe (Sulzfeld, Germany).

Animal Housing and Husbandry/Seminatural Abiotic Entrainment

Before the mice were placed outdoors in the garden, they were adapted to the natural photoperiod in an unheated room for at least 3 weeks (average temperature 10 °C, minimum 8 °C, maximum 12 °C). The mice

Figure 1. The experimental setup in the backyard of the Dr. Senckenbergische Anatomie, as seen from a balcony of an office in the third floor. The driveway to the right is a moderately frequented cul-de-sac, and the metal-plated gate and the driveway to the left lead to the cellar of the institute. The building in the center is a storage and maceration facility. The insert shows the wire mesh box, its plastic roof, and the individual cages.

were kept singly in cages equipped with an infrared camera, a hiding box, and nesting material and with food and water ad libitum. The experimental setup in the back garden of the Dr. Senckenbergische Anatomie in Frankfurt am Main, Germany (50°, 5' N; 8°, 39' E) is shown in Figure 1. The cages, equipped as described above, were placed in a big wire mesh box to protect the mice from predators; an acrylic glass roof provided protection from rain. Once a week, the cages were taken out of the wire mesh box and cleaned. The cleaning was carried out on different workdays in order not to induce a 7-day rhythm caused by the cleaning procedure. On that occasion, the mice were weighed once a month to control for possible health problems.

Data Acquisition

Data were continuously recorded in 10-min intervals over a period of 365 days in the year of 2017 using an automated recording system (Mouse-E-Motion, Hamburg, Germany) as described (Pfeffer et al., 2012; Pfeffer et al., 2015; Wicht et al., 2014). The detectors recorded simultaneously the following (in 10-min intervals):

- locomotor activity [counts],
- temperature [°C],
- humidity [%], and
- ambient light [uncalibrated readout 0-500].

The uncalibrated readouts from the sensors were counterchecked by measurements with a calibrated luxmeter. At daytime, the light intensity within the

cages ranged between 4.100 and 68.800 lux; in the night, the intensity was between 0.5 and 0.6 lux. To obtain more data on the light conditions, we also collected meteorological data on clouds from meteorological archives (https://www.meteoblue.com/de/wetter/historyclimate/weatherarchive/frankfurt-am-main-deutschland_2925533) and converted them in a “scoring system” (1 = sunny to 4 = overcast).

The raw data obtained from the sensors were tabulated in Microsoft's Excel; self-written programs in Visual Basic were used for data analysis and visualization.

Data Visualization

Double-plotted actograms were generated using Clocklab software (Actimetrics, Wilmette, IL) as described (Pfeffer et al., 2012). Cloud maps, double-plotted temperature and humidity maps, as well as double-plotted actograms for analysis (in 10-min resolution) were generated using Excel's graphic functions (Fig. 2), using algorithms that were programmed in Visual Basic. For purely graphical reasons (better visualization of percentiles, see below), the background of these actograms was set to black, and activity was represented by a gray scale, where white denotes the highest activity (Fig. 3).

Data Analysis

The time bases for the raw data was Central European Time (CET) and Central European Summer Time (CEST), respectively. The CEST times were reset to CET for all analyses and calculations. Throughout the article, these clock readings in CET [h] and the durations in [h] will be given in the format of [hours:decimal fractions of hours].

The following parameters were extracted from the raw data for each day.

The time points of lights-off/-on [hCET] were determined from the readouts of the sensors. They corresponded—within a range of error of 10 min—to the end of the civil twilight and sunrise (ca. 2-3 lux), respectively, as read off from astronomical tables for Frankfurt am Main. With respect to these time points, the duration of the dark phase [h]; the average temperature during the light phase, TempLight [°C]; during the dark phase, TempNight [°C]; and for the entire 24-h period, TempDay [°C] were calculated. The same procedure was applied to the data on humidity.

The raw data on the animals' activity [counts/10 min] were treated in the following way (see Fig. 4). For each mouse and for each 24-h period, starting in the middle of the animals' rest phase (i.e., at 13:67 [hCET]), the total daily activity (counts) for the

Figure 2. A visualization of the raw data as obtained from the sensors in 10-min intervals, all shown as double plots, with the exception of the cloud maps on the left, which show the morning/afternoon conditions.

subsequent 24 h was calculated. With respect to the time points determined for lights-on/-off (see above), we calculated the (dimensionless) daily diurnality index (activity in the light phase – activity in the dark phase/total activity; Hoogenboom et al., 1984).

To estimate the phasing and the duration of the locomotor activity in relation to external time and lights-on/-off and temperature, we used the following strategy (Wicht et al., 2014; Fig. 4): the total daily activity was calculated as described above. We then calculated, again for each mouse and day, those points in time [hCET] at which the mouse had “accomplished” 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, and 90% of its locomotor workload of the respective day. We call those time points the positions of the percentiles; their dimension is [hCET]. The positions of the 10% and the 90% percentiles were used to calculate the duration of the (main) activity period [h].

The position of the 50th percentile, the median of activity (MoA; [hCET]), can be used to chronotype the mouse, either on a daily basis or by averaging the MoA over longer periods of time (Wicht et al., 2014; also see below). In this article, we generally used averages (mean MoA) over 30 days. In addition, the scatter of the MoA within the averaging periods can be used to estimate the stability of the chronotype, which, in turn, is a good measure of general rhythm stability (Wicht

et al., 2014). As a measure of this scatter, we report the interquartile range (IQR; [h]) of the MoA; a low IQR thus indicates a relatively stable chronotype.

Averaging Procedures and Correlational Analyses

One-Year Averages/Grand Means. For the daily measurements of the total daily activity [counts], the duration of the activity period [h], the chronotype [MoA, hCET], and its stability [h], as well as for the diurnality indices we calculated the mean values of these parameters over the entire observation period (1 year) for each mouse and report them in box plots (Fig. 5).

Analysis of Seasonal Changes. A somewhat more sophisticated technique was used for the (strain-specific) analyses of the seasonal fluctuations (see Fig. 6) of the total daily activity [counts], the duration of the activity period [h], the diurnality index, the daily chronotype (MoA, [hZT]), and the stability of the chronotype (IQR of mean MoA [h]). Toward this end, we pooled the data from the mice of the 2 different strains.

First, we calculated the daily means of the above-mentioned parameters for the 6 C75Bl and the 6 C3H mice, respectively (“pooling”). We then entered these pooled daily data from the 2 strains in separate tables

Figure 3. Classical (A, C) and inverted (B, D) double-plotted actograms of a C3H and a C57Bl mouse at a resolution of 10 min. In the inverted actograms, the correction Central European Summer Time → Central European Time has been performed (note the offset in the classical actograms). The time points of lights-off (blue) and lights-on (yellow) have been imported into the inverted actograms. They also show the (color-coded) position of the daily percentiles in time. The bottom part of the figure (E, F) shows the results of a fast Fourier transformation of the time series of the locomotor data. Note that there is spectral power only in the 1 cycle/day frequency (and, of course, in the harmonics thereof); there are no other infra- or ultradian rhythms.

(which again covered the whole year) and generated floating 30-day averages of the measurement parameters. The 30 values of each of those floating averages were then statistically compared (Student's *t*-test, see below) to all 365 values in the table to identify significant (monthly) deviations from the grand (yearly) mean.

Correlational Analyses. For the pooled (see above) behavioral data of the 2 strains and for each day, we performed correlations of all the abiotic parameters (duration of the dark phase, temperature and humidity data, data on clouds) with all of the behavioral parameters (total activity, duration of the activity period, positions of percentiles, diurnality indices). Some, but not all, of these correlations are shown in Figures 7 and 8. We also correlated the abiotic parameters with each other. All correlations

were straightforward linear Pearson correlations. Note that we do report the r^2 of the correlations (i.e., the coefficient of determination). Correlations with an r^2 of less than 0.3 were regarded as insignificant.

Statistical Comparisons

The large data sets from the seasonal averaging procedures showing normal, Gaussian distributions were compared using Student's *t*-test (2 sided). Since these tests included multiple (i.e., 365) comparisons of 30-day samples with the full-year sample (see above), we performed a Bonferroni correction and reset the significance level for these tests to $p < 0.00001$. The Mann-Whitney *U*-test was used to compare the smaller (non-Gaussian) data sets from the yearly averages and the correlational analyses.

Figure 4. The figure shows different stages (A-C) of the analytical “processing” of a 30-day segment of an inverted actogram (from a C57Bl mouse). The time points of lights-off and -on have been imported as blue and yellow lines, respectively. The figure is meant to explain the analytical methods used to parametrize the locomotor data in graphics and keywords (see the Materials and Methods section for a more detailed description).

Fourier Analysis

To reveal the possible presence of infra- or ultradian rhythms, we entered the raw data on locomotor activity [counts/10 min] for each mouse in an Internet-based tool for Fourier analyses (<https://sooeet.com/math/online-fft-calculator.php>).

RESULTS

Animal Health

All animals survived the outdoor stay over 365 days without noticeable health problems. During the

experiment, there were no significant changes in body weight; the average weight of the C57Bl/C3H was 25.3/31.4 g in the beginning of the experiment and 25.7/33.0 g at the end. We did not observe any parasites (ticks or alike) on the mice or in the cages.

Spectral Analysis

Within the first 2 weeks after the release into outdoor conditions, all mice were entrained to the side-real cycle, as seen in the fast Fourier analysis of the frequency spectrum of the locomotor data (Fig. 3). There was only power in the 1-cycle/day frequency in both strains. We could not detect any infra- or ultradian rhythms; in particular, we did not find any

Figure 5. Box plots (A-F) comparing the grand means (over the full year) of different parameters (see labeling) of the 6 C3H mice (white) to those of the 6 C57Bl (gray shading). The p values stem from nonparametric (Mann-Whitney U test) testing.

signs of spectral power within the 7-day (weekday/ weekend) range. We could also not detect any rhythmicity within a 30 -day (lunar) period.

Overall Analysis/Grand (Yearly) Means

By and large, the 2 strains retained their locomotory pattern as known from the laboratory, with a double-peak activity pattern and relatively late chronotype in the C57Bl mice and a single-peak pattern and a relative early chronotype in the C3H animals (Fig. 5B). The stability of the chronotype—in the grand mean—did not differ (Fig. 5C). On average, the C3H mice were more active (Fig. 5A) and had a longer main activity period (Fig. 5D). Both strains remained chiefly nocturnal, but overall, the C3H mice showed significantly more daytime activity than the C57Bl mice (Fig. 5E).

Correlational Analyses

We did, of course, find a very strong correlations between the abiotic parameters. The timing of lights-off [hCET] predicts that of lights-on [hCET] with almost 100% certainty ($r^2 = 0.99$; data not shown); therefore, the duration of the dark phase [h] can be used to substitute these 2 measures in the correlations. The duration of the dark phase [h] is also a good predictor of all parameters related to temperature and humidity (in the range of $r^2 = 0.60$; data not shown). Yet, we could not find any noteworthy correlations between the behavioral data and the humidity or the cloud data (data not shown), but light and temperature do correlate with the timing of behavioral features (see below).

In Figure 7, we plotted the duration of the dark phase versus the total daily activity, the duration of the activity period, and the temporal positions of

Figure 6. Bar graphs showing the seasonal alterations with respect to different parameters (see labeling). The data for the C3H group are shown on the left and those for the C57Bl group on the right. Each bar in the bar graphs corresponds to the average value of the respective parameter of 6 mice on one particular day. The data are plotted against the yearly mean value of the respective group. The thick black lines along the abscissa indicate periods of time during which the respective measurement values of the group were significantly higher or lower than the yearly average ($p < 0.00001$, Student's t -test, Bonferroni corrected; see the Materials and Methods section for details).

some of the percentiles. The 20% percentiles are most tightly coupled to the duration of the dark phase in both strains; notably, the coupling is much stronger in the C3H (Fig. 7E) than in the C57Bl (Fig. 7F). This difference in the coefficients of determination is significant (Fig. 5F). In the later percentiles (50%, 90%), the

coupling becomes increasingly weaker in the C3H (Fig. 7E) and even vanishes completely in the C57Bl (Fig. 7F), where the slope of the regression lines is close to zero. Correspondingly, the duration of the dark phase has very little predictive power on the duration of the main activity period in C57Bl

Figure 7. A correlational analysis (based on the daily measurements of the individual mice) of the duration of the dark phase versus total daily activity (A, B), duration of the activity period (C, D), and the timing of the 10% (light green), 20% (dark green), 50% (red), and 90% (blue) percentiles (E, F) in C3H mice (left) and C57Bl mice (right). The regression lines and the corresponding r^2 values stem from linear Pearson correlations.

(Fig. 7D) and only moderate such power in C3H (Fig. 7C). The predictive power of the duration of the dark phase on the total daily activity is practically absent in C57Bl and very moderate in C3H (Fig. 7A, B).

Ambient temperature influences the timing as well. We found that the average temperature during the dark phase (TempNight [°C]), when the mice are active, had the most predictive power. The correlations versus the total daily activity, the duration of the activity period, and the temporal positions of the percentiles are plotted in Figure 8. Notably, the total daily activity did not correlate or only barely

correlated with the ambient temperature at night in both strains (Fig. 8A, B). The timing of activity, however, did. The temperature at night is a good predictor for the timing of the early percentiles (Fig. 8E, F), but its predictive power is less than that of the duration of the dark phase (compare Figs. 7E, F and Fig. 8E, F). There was, however, a good correlation between the duration of the activity period and the temperature at night in the C3H strain (Fig. 8C) and a moderate correlation in C57Bl animals (Fig. 8D), which, in both cases, are stronger correlations than those supplied by the duration of the dark phase (see

Figure 8. Correlational analysis (based on the daily measurements of the individual mice) of the nightly average temperature versus total daily activity (A, B), duration of the activity period (C, D), and the timing of the 10% (light green), 20% (dark green), 50% (red), and 90% (blue) percentiles (E, F) in C3H mice (left) and C57Bl mice (right). The regression lines and the corresponding r^2 values stem from linear Pearson correlations.

above and compare with Fig. 7C, D). The same holds true for the relations of the nightly temperature to the 90% percentiles. Again, if one compares the slopes, the C57Bl are less influenced by this parameter than the C3H.

Seasonal Variations

The C3H mice showed clear seasonal differences in the chronotype (Fig. 6C) and the stability of the chronotype (Fig. 6E). The animals shift to a later and much more stable chronotype in summer. Moreover, they show more total daily activity in summer than in winter

(Fig. 6A), and the duration of the activity period is shorter in summer than in winter (Fig. 6G). These seasonal differences were not observed in the C57Bl mice (Fig. 6B-H). The C57Bl animals do not regulate their chronotype in a seasonal manner (Fig. 6D) and have stable and unstable periods that alternate in a nonpredictable manner (Fig. 6F). In the C57Bl animals, the seasonal regulation of the duration of the activity period is not as pronounced as in C3H mice (Fig. 6H). The C57Bl display much more daytime activity in summer than in winter (Fig. 6J). This activity occurs particularly right after dawn (Fig. 3C, D). The C3H mice showed a different pattern (Fig. 6I). They had a relatively diffuse

daytime activity in spring and summer that vanished after the summer solstice (see also Fig. 3A, B).

With regard to the total daily activity, we observed 2 periods of increased activity ("arousal") in both strains, around the time of the equinoxes: one in spring and one in autumn (Fig. 3; Fig. 6A, B). The arousal was stronger in autumn than in spring, and it could not be correlated with any of the abiotic parameters or any unusual observations. Both arousal periods occurred at times when the temperature at night was between 10 and 15 °C (Fig. 8A, B).

At the end of the experiment, some C57Bl mice did lose their biphasic activity pattern and switched to a more diffuse but still nocturnal activity pattern (Fig. 3). The C3H animals, on the other hand, did not show any sign of such a pattern change within the duration of the experiment (Fig. 3).

DISCUSSION

Indoors-Outdoors

Under the conditions we have chosen, several results obtained under the entraining conditions in the anatomical backyard resemble those obtained in the laboratory flanking that yard (Banks et al., 2015; Pfeffer et al., 2012; Pfeffer et al., 2017; Shimomura et al., 2001; von Gall et al., 1998; Wicht et al., 2014). The C3H animals did retain their earlier chronotype and their monophasic activity pattern; the C57Bl animals showed a biphasic activity pattern and a later chronotype, as they do in the lab. Both mouse strains maintained their predominantly nocturnal phenotype.

This is in contrast to the findings of 2 recent studies, which showed that the activity of mice changed to a diurnal pattern during the summer months under seminatural conditions (Daan et al., 2011; Spoelstra et al., 2016). These studies, however, were carried out in large enclosures with hundreds of freely moving mice of both sexes; they were reproducing and had to avoid (airborne) predators. Furthermore, these studies did not record entire daily activity profiles but only counted approaches to the food source that was supplied within the enclosures, at which the mice again had to compete for food (Daan et al., 2011; Spoelstra et al., 2016).

The diurnal pattern observed in these mice during the summer months may thus rather reflect the feeding rhythm in a competitive environment. It is known that a negative energy balance can induce a change in the circadian phenotype, probably as part of an energy-saving strategy (Hut et al., 2011; Schubert et al., 2010; van der Vinne et al., 2014). Indeed, the

circadian organization in nocturnal mammals shows considerable phenotypic plasticity in response to energetic challenges (Mistlberger, 2009). However, under the energy-balanced condition, which we provided in our outdoor study (and also in all previous laboratory studies), food intake will primarily occur during the night (for a laboratory study, see Fischer et al., 2017).

Behavioral differences between indoor and outdoor conditions are also known from other rodents (reviewed by Calisi and Bentley, 2009); often, individual animals of a species that shows a diurnal behavior in the field will (individually) switch to either nocturnal, crepuscular, or fragmented activities in the laboratory. Notably, these observations are based not on inbred but on natural heterozygous populations of animals, which may account for the differences between these individuals and our inbred mice.

Photoperiod, Temperature, and Entrainment

The photoperiod was the most potent abiotic entraining factor under the outdoor conditions we have chosen, quite irrespective of the light intensity, since the timing of the behavior did not differ between cloudy and sunny days. Moonlight and moon phase have been shown to suppress activity in nocturnal rodents (Prugh and Golden, 2014). However, we could not detect any influence of moonlight on the activity level of both mouse strains. This might be due to the location of the city in our experiment. The street lights probably extinguished the possible effects of moonlight. Furthermore, no ultradian rhythms or any signs of spectral power within the 7-day range, which would unravel a weekday/weekend pattern, were observed. This shows that the mice did not entrain to the human activities in their surroundings, which differ between weekdays and weekends.

The sidereal shift of the photoperiod combined with the percentile method used here permitted a numerical, quantitative analysis of the entraining effect of the photoperiod. The behavior of both mouse strains is chiefly entrained at the beginning of their main activity period; the timing of the "early percentiles" (10%/20%) is under a much greater influence of the photoperiod than that of the late percentiles. As evident from the magnitude of the coefficients of determination, this effect is much more pronounced in the C3H than in the C57Bl mice.

Since the early percentiles occur around dusk, it seems quite likely that the disappearance of light (lights-off) is the main entraining signal. In this context, it should be noted that lights-off elicits electrical activity in subsets of SCN neurons in rodents

(Aggelopoulos and Meissl, 2000; van der Leest et al., 2007) and may thus indeed trigger immediate behavioral responses.

Whereas lights-off clearly entrains the onset of the main activity period, the later percentiles are barely affected by light. This raises the question as to which factor(s) determine(s) the end and, thus, the duration of the activity period. In the C3H mice, the photoperiod has a moderate influence, since the duration of the dark phase predicts approximately 40% of the duration of the activity period. However, the remaining 60% of the variations appear to be affected by stimuli not yet identified. In C57Bl animals, the duration of the activity period is not at all affected by the photoperiod, and thus, other stimuli are definitely needed to determine this parameter.

In fact, temperature may have a major influence. Among all parameters we determined, the temperature (in particular, the temperature at night in the respective cycle) was the best predictor of the duration of the activity period in that cycle. The predictive power of this parameter with regard to the duration of the activity period is higher than that of the duration of the dark phase and amounts to 65% in C3H and 40% in C57Bl. Indeed, ambient temperature has been shown to trigger substantial changes in rhythmicity in mice and voles (Ishii et al., 1996; Refinetti, 2010), and with regard to entrainment strength, temperature can be a modulator as strong as light (Refinetti, 2015).

The total daily activity of both strains varied in a manner that was nearly unpredictable from the daily abiotic cues. In the C3H group, there was higher activity on short, warm nights, while the C57Bl group did not show any trend at all. Notably, the C3H mice were more active under the outdoor conditions as compared with the C57Bl animals, whereas, under laboratory conditions, the total activity levels of the 2 strains did not differ (Homola et al., 2015; Wicht et al., 2014).

Strain-Specific Differences and Entrainment

Also in the laboratory, differences in the entrainability of the 2 strains are evident: the strains differ in terms of the light-induced phase shift in locomotor activity (Pfeffer et al., 2012; von Gall et al., 1998). Jet lag experiments in the laboratory have shown that the C3H reentrains almost twice as fast as the C57Bl (Pfeffer et al., 2012; Pfeffer et al., 2018).

The differences in the entrainability between the 2 strains may be attributed to differences in the melatoninergic system (Pfeffer et al., 2012; Pfeffer et al., 2018; von Gall et al., 1998). The C57Bl mice are melatonin deficient due to a truncation in the gene encoding the AANAT (Roseboom et al., 1998), whereas the C3H mice are melatonin proficient (Goto et al., 1989). Melatonin, the hormone of the pineal gland, is

secreted at night, and the duration of melatonin production reflects the duration of the dark period. Thus, daily melatonin secretion is prolonged in winter (when nights are longer) as compared with the summer (Illnerova and Vanecek, 1985; Pévet, 2003). Therefore, melatonin is believed to be a major endocrine output signal of the timekeeping system (Korf et al., 2018; Pévet, 2002) that synchronizes the remainder of the body with the clock. Melatonin deficiency or the deletion of both melatonin receptors (MT1 and MT2) have been shown to decrease the stability of activity rhythms in mice also under stable laboratory conditions (Pfeffer et al., 2017).

Therefore, it is tempting to speculate that some differences between both strains may be related to their melatonin proficiency or deficiency, respectively. However, it should be borne in mind that the 2 strains also differ in many other respects. One example is the visual and circadian function of the retina. C3H mice are visually blind due to retinal degeneration, but they retain the melanopsin-containing ganglion cells that are important for the entrainment of the circadian system (reviewed by Peirson et al., 2018). Strangely enough, the visually blind C3H do couple their behavior much more tightly to the photoperiod than the C57Bl, and there currently is no explanation for this effect.

Seasonality

An important finding of our study concerns seasonality. The C3H animals “do follow the seasons,” while the C57Bl do not. In particular, the C3H have a relatively short activity period, relatively high levels of activity, and a relatively late and stable chronotype in summer; the situation is reversed in winter. A seasonal plasticity of the chronotype in man has been reported in previous studies (Allebrandt et al., 2014; Murray et al., 2003; Shawa et al., 2018); our study indicates that this plasticity may, in fact, have a genetic background.

Such pronounced seasonal changes did not occur in the C57Bl mice. The nonalignment with the photoperiod is reflected in their diurnality index: their low entrainability leads to a (pseudo-)regulation of their diurnality, as seen in Figure 6J. Simply because they will not follow the photoperiod, the late stretches of their main activity period in summer will occur after dawn. If such a nonentrainment occurred in wild mice out in the field, it would actually open a (potentially dangerous or advantageous) temporal ecological niche that could not be occupied by animals that are more strictly entrained to the photoperiod.

At the end of the experiment, some C57Bl mice lost their biphasic pattern, switching to a more diffuse activity pattern, but they stayed nocturnal. It is tempting to attribute this phenomenon to the aging of the

animals during the experiment, since it is known that the circadian output loses its strength with age (Banks et al., 2015; Farajnia et al., 2012; Nakamura et al., 2011). Under laboratory conditions, desynchronized activity rhythms become apparent at the age of 18 months or 500 days, respectively (Banks et al., 2015; Farajnia et al., 2012), but middle-aged mice already show fragmented activity patterns (Nakamura et al., 2011). Our mice were well under 18 months of age, but under seminatural conditions, there are more changing variables in contrast to the laboratory, which might put additional stress on the entrainability of these mice. Again, the stabilizing factor may be melatonin, since the melatonin-proficient C3H animals did not show altered activity rhythms within the time span of the experiment. In addition, also under stable laboratory conditions, melatonin deficiency or the deletion of both melatonin receptors has been shown to decrease the stability of activity rhythms in mice (Pfeffer et al., 2017).

Both mouse strains did show significantly increased levels of total daily activity around the time of the spring and autumn equinoxes, and one is inclined to speak about “arousal.” These periods of arousal could not be correlated with any of our measured parameters (i.e., temperature, humidity, or any unusual observation). From an astronomical point of view, the weeks around the equinoxes are characterized by the most rapid changes in the duration of the light and dark phase. The endogenous oscillator in the SCN does, of course, entrain to the seasons (van der Leest et al., 2007) and is thus subjected to the most rapid shifts in the entraining stimuli around the equinoxes. This might arouse a mouse.

It might arouse a mouse researcher that—under these conditions—it might not be the best idea to keep mice in the lab under 12:12 light/dark cycles. For C3H mice in particular, this cycle length corresponds to the time point at which they “switch” forth and back from their early and relatively unstable winter chronotype to the later and much more stable summer type.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Dr. Senckenbergische Stiftung (H.-W. Korf). We thank Claudia Fischer for assistance with the mice.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

ORCID ID

Martina Pfeffer <https://orcid.org/0000-0001-5354-6005>

REFERENCES

- Aggelopoulos NC and Meissl H (2000) Responses of neurones of the rat suprachiasmatic nucleus to retinal illumination under photopic and scotopic conditions. *J Physiol* 523:211-222. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00211.x
- Allebrandt KV, Teder-Laving M, Kantermann T, Peters A, Campbell H, Rudan I, Wilson JF, Metspalu A, and Roenneberg T (2014) Chronotype and sleep duration: the influence of season of assessment. *Chronobiol Int* 31:731-740. doi:10.3109/07420528.2014.901347
- Aschoff J (1954) Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* 41(3):49-56.
- Banks G, Heise I, Starbuck B, Osborne T, Wisby L, Potter P, Jackson IJ, Foster RG, Peirson SN, and Nolan PM (2015) Genetic background influences age-related decline in visual and nonvisual retinal responses, circadian rhythms, and sleep. *Neurobiol Aging* 36:380-393.
- Calisi RM and Bentley GE (2009) Lab and field experiments: are they the same animal? *Hormones Behav* 56:1-10.
- Daan S, Spoelstra K, Albrecht U, Schmutz I, Daan M, Daan B, Rienks F, Poletaeva I, Dell’Omo G, Vyssotski A, et al. (2011) Lab mice in the field: unorthodox daily activity and effects of a dysfunctional circadian clock allele. *J Biol Rhythms* 26:118-129. doi:10.1177/0748730410397645
- Farajnia S, Michel S, Deboer T, Tjebbe van der Leest H, Houben T, Rohling JH, Ramikisoensing A, Yaenkov R, and Meijer JH (2012) Evidence for neuronal desynchrony in the aged suprachiasmatic nucleus clock. *J Neurosci* 32:5891-5899.
- Fischer C, Mueller T, Pfeffer M, Wicht H, von Gall C, and Korf HW (2017) Melatonin receptor 1 deficiency affects feeding dynamics and pro-opiomelanocortin expression in the arcuate nucleus and pituitary of mice. *Neuroendocrinology* 105:35-43.
- Goto M, Oshima I, Tomita T, and Ebihara S (1989) Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J Pineal Res* 7:195-204.
- Homola M, Pfeffer M, Fischer C, Zimmermann H, Robson SC, and Korf HW (2015) Expression of eonucleotidases in the prosencephalon of melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57Bl mice: spatial distribution and time-dependent changes. *Cell Tissue Res* 362:163-176.
- Hoogenboom I, Daan S, Dallinga J, and Schoenmakers M (1984) Seasonal change in the daily timing of behaviour of the common vole, *Microtus arvalis*. *Oecologia (Berlin)* 61:18-31.
- Hut RA, Pilon V, Boerema AS, Strijkstra AM, and Daan S (2011) Working for food shifts nocturnal mouse activity into the day. *PLoS One* 6:e17527.

- Illnerova H and Vanecek J (1985) Complex control of the circadian rhythm in pineal melatonin production. In: B Mess, C Ruzsas, L Tima, and P Pévet, editors. *The pineal gland: current state of pineal research*. Budapest: Ohademiai Kiado. p. 137-153.
- Ishii K, Kuwahara M, Tsubone H, and Sugano S (1996) The telemetric monitoring of heart rate, locomotor activity, and body temperature in mice and voles (*Microtus arvalis*) during ambient temperature changes. *Lab Anim* 30:7-12.
- Korf HW and von Gall C (2012) Circadian physiology. In: Pfaff DW, editor. *Textbook of neuroscience in the 21st century: basic and clinical*. New York (NY): Springer. p. 1813-1845.
- Korf HW (2018) Signaling pathways to and from the hypophyseal pars tuberalis, an important center for the control of seasonal rhythms. *Gen Comp Endocrinol* 258:236-243.
- Mistlberger RE (2009) Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci* 9:1718-1729. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06965.x.
- Murray G, Allen NB, and Trinder J (2003) Seasonality and circadian phase delay: prospective evidence that winter lowering of mood is associated with a shift towards eveningness. *J Affect Disord* 76:15-22. doi:10.1016/S0165-0327(02)00059-9
- Mrosovsky N (1996) Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev* 71:343-372.
- Nakamura TJ, Nakamura W, Yamazaki S, Kudo T, Cutler T, Colwell CS, and Block GD (2011) Age-related decline in circadian output. *J Neurosci* 31:10201-10205.
- Pévet P (2002) Melatonin. *Dialog Clin Neurosci* 4:57-72.
- Pévet P (2003) Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol* 15:422-426.
- Peirson SN, Brown LA, Pothecary CA, Benson LA, and Fisk AS (2018) Light and the laboratory mouse. *J Neurosci Methods* 300:26-36.
- Pfeffer M, Rauch A, Korf HW, and von Gall C (2012) The endogenous melatonin (MT) signal facilitates reentrainment of the circadian system to light-induced phase advances by acting upon MT2 receptors. *Chronobiol Int* 29:415-429.
- Pfeffer M, Korf HW, and von Gall C (2015) Chronotype and stability of spontaneous locomotor activity rhythm in BMAL1-deficient mice. *Chronobiol Int* 32:81-91. doi:10.3109/07420528.2014.956218
- Pfeffer M, Korf HW, and Wicht H (2017) The role of the melatoninergic system in light-entrained behavior of mice. *Int J Mol Sci* 18:530-538.
- Pfeffer M, Korf HW, and Wicht H (2018) Synchronizing effects of melatonin on diurnal and circadian rhythms. *Gen Comp Endocrinol* 258:215-221. doi:10.1016/j.ygcen.2017.05.013
- Prugh LR and Golden CD (2014) Does moonlight increase predation risk? Meta-analysis reveals divergent responses of nocturnal mammals to lunar cycles. *J Anim Ecol* 83:504-514.
- Refinetti R (2002) Compression and expansion of circadian rhythm in mice under long and short photoperiods. *Integrative Physiol Behav Sci* 37:114-127.
- Refinetti R (2004) Non-stationary time series and the robustness of circadian rhythms. *J Theor Biol* 227:571-581. doi:10.1016/j.jtbi.2003.11.032
- Refinetti R (2010) Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice. *J Biol Rhythms* 25:247-256
- Refinetti R (2015) Comparison of light, food, and temperature as environmental synchronizers of the circadian rhythm of activity in mice. *J Physiol Sci* 65:359-366. doi:10.1007/s12576-015-0374-7
- Roseboom PH, Namboodiri MA, Zimonjic DB, Popescu NC, Rodriguez IR, Gastel JA, and Klein DC (1998) Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res* 63:189-197.
- Schubert KA, Boerema AS, Vaanholt LM, De Boer SF, Strijkstra AM, and Daan S (2010) Daily torpor in mice: high foraging costs trigger energy-saving hypothermia. *Biol Lett* 6:132-136.
- Shawa N, Rae DE, and Roden LC (2018) Impact of seasons on an individual's chronotype: current perspectives. *Nat Sci Sleep* 10:345-354. doi:10.2147/NSS.S158596
- Shimomura K, Low-Zeddies SS, King DP, Steeves TD, Whiteley A, Kushla J, Zemenides PD, Lin A, Vitaterna MH, Churchill GA, et al. (2001) Genome-wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice. *Genome Res* 11:959-980.
- Spoelstra K, Wikelski M, Daan S, Loudon AS, and Hau M (2016) Natural selection against a circadian clock gene mutation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:686-691.
- van der Leest HT, Houben T, Michel S, Deboer T, Albus H, Vansteensel MJ, Block G, and Meijer JH (2007) Seasonal encoding by the circadian pacemaker of the SCN. *Curr Biol* 17:468-473.
- van der Vinne V, Riede SJ, Gorter JA, Eijer WG, Sellix MT, Menaker M, Daan S, Pilorz V, and Hut RA (2014) Cold and hunger induce diurnality in a nocturnal mammal. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:15256-15260.
- van Oosterhout F, Lucassen EA, Houben T, Tjebbe van der Leest H, Antle MC, and Meijer JH (2012) Amplitude of the SCN clock enhanced by the behavioral activity rhythm. *PLoS One* 7:e39693.
- von Gall C, Duffield GE, Hastings MH, Kopp MD, Dehghani F, Korf HW, and Stehle, JH (1998) CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. *J Neurosci* 18:10389-10397.
- Wicht H, Korf HW, Ackermann H, Ekhardt D, Fischer C, and Pfeffer M (2014) Chronotypes and rhythm stability in mice. *Chronobiol Int* 1:27-33 doi:10.3109/07420528.2013.820739

3. Darstellung des eigenen Anteils an der Publikation

In Bezug auf das Paper mit dem Title „Seasonal Variations of Locomotor Activity Rhythms in Melatonin-Proficient and -Deficient Mice under Seminatural Outdoor Conditions“ war meine Aufgabe zunächst die Literaturrecherche mit dem Fokus auf chronologische Experimente unter seminatürlichen/natürlichen Bedingungen durchzuführen. In Fortbildungen präsentierte ich regelmäßig meine Resultate. Durch die Mitarbeit an vorherigen Experimenten war ich mit den im Paper genannten Mäusestämmen vertraut und wurde auch in mit der Mitentwicklung der Fragestellung und Planung des o.g. Versuches beauftragt.

Die Durchführung des Versuches fiel in meinen Verantwortungsbereich. Darunter zählt u.a. die Beschaffung der Ressourcen und das wöchentliche Erheben der gesammelten Rohdaten. In den darauffolgenden Arbeitsschritten formatierte ich die Rohdaten, sodass sie mit dem o.g. Programme verarbeitet und visualisiert werden konnten.

Im Bereich der Auswertung wurde ich mit den Korrelationsanalysen, den Box plots und deren U-/t-Test beauftragt. Die Ergebnisse stellte ich in den Instituts-internen Fortbildungen zur Diskussion.

Die Erstellung des Papers und dessen Veröffentlichung wurde mir vor allem durch die Mithilfe meiner Betreuer ermöglicht.

4. Literaturverzeichnis

1. Aschoff J. Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften*. 1954;41(3):49-56.
2. Hardeland R, Madrid JA, Tan D-X, Reiter RJ. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res*. 2012;52(2):139-166. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00934.x
3. Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;(217):3-27. doi:10.1007/978-3-642-25950-0_1
4. Zhang EE, Kay SA. Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(11):764-776. doi:10.1038/nrm2995
5. Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol*. 2014;24(2):90-99. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.002
6. Korf H-W, von Gall C. Circadian Physiology. In: Pfaff DW, Volkow ND, eds. *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*. Springer; 2016:2203-2239. doi:10.1007/978-1-4939-3474-4_65
7. Claustat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*. 2015;61(2-3):77-84. doi:10.1016/j.neuchi.2015.03.002
8. Oishi A, Cecon E, Jockers R. Melatonin Receptor Signaling: Impact of Receptor Oligomerization on Receptor Function. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018;338:59-77. doi:10.1016/bs.ircmb.2018.02.002
9. Agorastos A, Kellner M, Baker DG, Otte C. When time stands still: an integrative review on the role of chronodisruption in posttraumatic stress disorder. *Curr Opin Psychiatry*. 2014;27(5):385-392. doi:10.1097/YCO.0000000000000079
10. Karthikeyan R, Marimuthu G, Spence DW, et al. Should we listen to our clock to prevent type 2 diabetes mellitus? *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;106(2):182-190. doi:10.1016/j.diabres.2014.07.029
11. Staiger H, Machicao F, Schäfer SA, et al. Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS One*. 2008;3(12):e3962. doi:10.1371/journal.pone.0003962
12. Arendt J. Shift work: coping with the biological clock. *Occup Med Oxf Engl*. 2010;60(1):10-20. doi:10.1093/occmed/kqp162
13. Straif K, Baan R, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol*. 2007;8(12):1065-1066. doi:10.1016/S1470-2045(07)70373-X
14. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Mrosovsky M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J Biol Rhythms*. 2003;18(1):80-90. doi:10.1177/0748730402239679
15. Pfeffer M, Wicht H, von Gall C, Korf H-W. Owls and larks in mice. *Front Neurol*. 2015;6:101. doi:10.3389/fneur.2015.00101
16. Wittmann M, Dinich J, Mrosovsky M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int*. 2006;23(1-2):497-509. doi:10.1080/07420520500545979

17. Homola M, Pfeffer M, Fischer C, Zimmermann H, Robson SC, Korf H-W. Expression of ectonucleotidases in the prosencephalon of melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57Bl mice: spatial distribution and time-dependent changes. *Cell Tissue Res*. 2015;362(1):163-176. doi:10.1007/s00441-015-2179-7
18. Mrosovsky N. Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1996;71(3):343-372. doi:10.1111/j.1469-185x.1996.tb01278.x
19. Refinetti R. Compression and expansion of circadian rhythm in mice under long and short photoperiods. *Integr Physiol Behav Sci Off J Pavlov Soc*. 2002;37(2):114-127. doi:10.1007/BF02688824
20. Refinetti R. Non-stationary time series and the robustness of circadian rhythms. *J Theor Biol*. 2004;227(4):571-581. doi:10.1016/j.jtbi.2003.11.032
21. von Gall C, Duffield GE, Hastings MH, et al. CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1998;18(24):10389-10397.
22. Wicht H, Korf H-W, Ackermann H, Ekhardt D, Fischer C, Pfeffer M. Chronotypes and rhythm stability in mice. *Chronobiol Int*. 2014;31(1):27-36. doi:10.3109/07420528.2013.820739
23. Goto M, Oshima I, Tomita T, Ebihara S. Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J Pineal Res*. 1989;7(2):195-204. doi:10.1111/j.1600-079x.1989.tb00667.x
24. Peirson SN, Brown LA, Pothecary CA, Benson LA, Fisk AS. Light and the laboratory mouse. *J Neurosci Methods*. 2018;300:26-36. doi:10.1016/j.jneumeth.2017.04.007
25. Roseboom PH, Namboodiri MA, Zimonjic DB, et al. Natural melatonin “knockdown” in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;63(1):189-197. doi:10.1016/s0169-328x(98)00273-3
26. Pfeffer M, Korf H-W, Wicht H. Synchronizing effects of melatonin on diurnal and circadian rhythms. *Gen Comp Endocrinol*. 2018;258:215-221. doi:10.1016/j.ygcen.2017.05.013
27. Pfeffer M, Rauch A, Korf H-W, von Gall C. The endogenous melatonin (MT) signal facilitates reentrainment of the circadian system to light-induced phase advances by acting upon MT2 receptors. *Chronobiol Int*. 2012;29(4):415-429. doi:10.3109/07420528.2012.667859
28. van Oosterhout F, Lucassen EA, Houben T, vanderLeest HT, Antle MC, Meijer JH. Amplitude of the SCN clock enhanced by the behavioral activity rhythm. *PLoS One*. 2012;7(6):e39693. doi:10.1371/journal.pone.0039693
29. Prugh LR, Golden CD. Does moonlight increase predation risk? Meta-analysis reveals divergent responses of nocturnal mammals to lunar cycles. *J Anim Ecol*. 2014;83(2):504-514. doi:10.1111/1365-2656.12148
30. Daan S, Spoelstra K, Albrecht U, et al. Lab mice in the field: unorthodox daily activity and effects of a dysfunctional circadian clock allele. *J Biol Rhythms*. 2011;26(2):118-129. doi:10.1177/0748730410397645
31. Spoelstra K, Wikelski M, Daan S, Loudon ASI, Hau M. Natural selection against a circadian clock gene mutation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(3):686-691. doi:10.1073/pnas.1516442113

32. van der Vinne V, Riede SJ, Gorter JA, et al. Cold and hunger induce diurnality in a nocturnal mammal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(42):15256-15260. doi:10.1073/pnas.1413135111
33. Schubert KA, Boerema AS, Vaanholt LM, de Boer SF, Strijkstra AM, Daan S. Daily torpor in mice: high foraging costs trigger energy-saving hypothermia. *Biol Lett*. 2010;6(1):132-135. doi:10.1098/rsbl.2009.0569
34. Hut RA, Piorz V, Boerema AS, Strijkstra AM, Daan S. Working for food shifts nocturnal mouse activity into the day. *PloS One*. 2011;6(3):e17527. doi:10.1371/journal.pone.0017527
35. Mistlberger R. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci*. 2009;30(9):1718-1729.
36. Ishii K, Kuwahara M, Tsubone H, Sugano S. The telemetric monitoring of heart rate, locomotor activity, and body temperature in mice and voles (*Microtus arvalis*) during ambient temperature changes. *Lab Anim*. 1996;30(1):7-12. doi:10.1258/002367796780744992
37. Refinetti R. Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice. *J Biol Rhythms*. 2010;25(4):247-256. doi:10.1177/0748730410372074
38. Pfeffer M, Korf H-W, Wicht H. The Role of the Melatonergic System in Light-Entrained Behavior of Mice. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3). doi:10.3390/ijms18030530
39. Farajnia S, Michel S, Deboer T, et al. Evidence for neuronal desynchrony in the aged suprachiasmatic nucleus clock. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2012;32(17):5891-5899. doi:10.1523/JNEUROSCI.0469-12.2012
40. Banks G, Heise I, Starbuck B, et al. Genetic background influences age-related decline in visual and nonvisual retinal responses, circadian rhythms, and sleep. *Neurobiol Aging*. 2015;36(1):380-393. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.040
41. Nakamura TJ, Nakamura W, Yamazaki S, et al. Age-related decline in circadian output. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2011;31(28):10201-10205. doi:10.1523/JNEUROSCI.0451-11.2011

5. Anhang

Danksagung

„Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung.“ – Charles Darwin

Einleitend mit diesen Worten, die durchaus zutreffend für die Entwicklungsphase unseres Versuches waren, möchte ich mich bei den Mitwirkenden bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen beiden genialen sowie geduldigen Betreuern PD Dr. Martina Pfeffer und PD Dr. Helmut Wicht. Nicht nur als hervorragende Wissenschaftler, sondern auch als gute Menschen standen sie mir stets zur Seite. Ohne die ermüdende, gedankliche Schweißarbeit, die sie während den Jahren in dieses Projekt investiert haben, hätte ich mich in den Irrwegen der scheinbar endlosen Exceltabellen verloren und die Dechiffrierung wäre mir verborgen geblieben.

Die Entstehung dieser Dissertation wäre ohne sie undenkbar gewesen.

Wenn ich an die vergangene Zeit denke, erinnere ich mich auch gerne an die Momente zurück, als die Blicke hoch oben von dem Balkon in den wilden grünen Garten des anatomischen Institutes schweiften und wir unseren Mäusen bei unserer Arbeit zu sahen. Momente in den auch Exkursionen in vergangene Zeiten und Anekdoten aus der Anatomie Bestandteil der universitären Lehre waren.

Ich bin dankbar für diese Augenblicke.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. Horst-Werner Korf für die Unterstützung und Ermöglichung des unkonventionellen Versuches bedanken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meiner Familie, die mich stets motivierte und mich mit handwerklichem und linguistischem Geschick unterstützte.

6. Lebenslauf

████████████████████

Gender	Percentage
Men	45%
Women	55%

[illegible]

Koblenz, den 02.11.2021

7. Schriftliche Erklärung:

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

“Seasonal Variations of Locomotor Activity Rhythms in Melatonin-Proficient and -Deficient Mice under Seminatural Outdoor Conditions”

in der Dr. Senckenbergische Anatomie

unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. Helmut Wicht mit Unterstützung durch PD Dr. Martina Pfeffer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Joshua Metzger, Helmut Wicht, Horst-Werner Korf, Martina Pfeffer. Journal of Biological Rhythms, Vol.:35, Issue 1, page 58-71, 2020

Frankfurt, den 16.11.2020

Joshua Metzger