

Aus dem Institut für Anatomie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die zirkadiane Rhythmik der murinen Retina als Funktion des Lebensalters

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Signe Kerkhoff
aus Hamm (Westf.)

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Spessert

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Mildenerger

Tag der Promotion: 18. März 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung und Ziel der Dissertation	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Ziel der Dissertation	2
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Der Aufbau des zirkadianen Systems	3
2.2 Entrainment des zirkadianen Uhrensystems.....	6
2.3 Uhrengene als Transkriptionsfaktoren	8
2.4 Das zirkadiane System der Retina.....	10
2.4.1 Die zirkadianen Uhren in der Retina	10
2.4.2 Der Einfluss der zirkadianen Uhr auf die Retina	11
2.4.2.1 Melatonin und Dopamin	11
2.4.2.2 Einfluss auf die Photorezeptoren	13
2.5 Der Einfluss des Alters auf das zirkadiane System.....	14
2.5.1 Der Einfluss des Alters auf den Inputweg ins zirkadiane System	14
2.5.2 Der Einfluss des Alters auf die Uhr im Nucleus suprachiasmaticus.....	14
2.5.3 Der Einfluss des Alters auf die Outputwege der zirkadianen Uhr im NSC.....	16
2.5.4 Der Einfluss des Alters auf die zirkadiane Uhr der Retina	16
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Material	17
3.1.1 Primer.....	18
3.2 Methoden	20
3.2.1 Versuchstiere	20

3.2.2 Entnahme der Retinae	20
3.2.3 RNA-Extraktion	21
3.2.4 Reverse Transkription	21
3.2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	22
3.2.6 Statistische Auswertung.....	24
4 Ergebnisse.....	28
4.1 Genexpression und tageszeitliche Genprofile in der Retina unter LD 12:12 bei jungen Mäusen (70 Tage).....	28
4.2 Genexpression und tageszeitliche Genprofile in der Retina unter LD 12:12 bei alten Mäusen (365 Tage).....	31
4.3 Einfluss des Alters auf die durchschnittliche Genexpression.....	34
4.4 Einfluss des Alters auf die tageszeitlichen Genprofile	37
5 Diskussion.....	40
5.1 Versuchsaufbau	40
5.2 ANOVA und Cosinoranalyse.....	41
5.3 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse	42
5.4 Genexpression in den Retinae junger Mäuse	44
5.5 Auswirkungen des Alters auf Genexpression und tageszeitliche Rhythmen	47
5.5.1 Auswirkungen des Alters auf Gene des molekularen Uhrmechanismus	47
5.5.2 Auswirkungen des Alters auf immediate early genes	49
5.5.3 Auswirkungen des Alters auf in den Sehprozess involvierte Gene.....	50
5.5.4 Auswirkungen des Alters auf Gene des dopaminergen Systems	50
5.5.5 Auswirkungen des Alters auf an der β -Oxidation beteiligte Gene.....	51
5.5.6 Auswirkungen des Alters auf Gene des Metabolismus und der Entgiftung	52
5.5.7 Auswirkungen des Alters auf die Phase tageszeitlicher Rhythmen	53
6 Zusammenfassung	54
7 Literaturverzeichnis.....	IV

8 Anhang	XVII
8.1 Tageszeitliche Expressionsprofile 70 und 365 Tage alter Mäuse (Werte).....	XVII
8.2 Tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina junger Mäuse (70 Tage) unter LD 12:12 (Graphen)	XXVI
8.3 Tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12 (Graphen)	XXVIII
8.4 Durchschnittliche Genexpression in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12.....	XXX
8.5 Tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12.....	XXXIII
9 Danksagung	XXXV

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
<i>Aanat</i>	Arylalkylamin-N-Acetyltransferase
Abb.	Abbildung
<i>Acadm</i>	Acyl-Coenzym A Dehydrogenase, auch MCAD (engl. Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase)
ad libitum	nach Belieben
<i>Arr1</i>	Arrestin 1
<i>Arr4</i>	Arrestin 4, auch <i>Car</i>
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
<i>Bmal1</i>	basic helix-loop-helix like ARNT like 1
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CCG	uhrenkontrolliertes Gen (engl. clock controlled gene)
cDNA	complementary DNA
<i>c-Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene, auch <i>Fos</i>
<i>Clock</i>	clock circadian regulator
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>Cpt1a</i>	carnitine palmitoyltransferase 1a
<i>Cry1, Cry2</i>	cryptochrome circadian regulator 1 und 2
C _T	engl. threshold cycle
CT	circadian time
D4-Rezeptor	Dopamin-Rezeptor 4
<i>Dbp</i>	D site albumin promoter binding protein
DD	Dauerdunkel
<i>Dec1</i>	basic helix-loop-helix family, member e40, auch <i>bhlhe40</i>
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
<i>Drd4</i>	dopamine receptor D4
D-Rezeptoren	Dopamin-Rezeptoren
<i>E4bp4</i>	nuclear factor, interleukin 3, regulated, auch <i>Nfil3</i>
E-Box	Verstärkerbox (engl. enhancer box)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Egr1</i>	early growth response 1, auch <i>Ngfia</i>
ERG	Elektroretinogramm
et al.	und andere (lat. et alii)
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GABA	γ-Aminobuttersäure (engl. gamma-aminobutyric acid)
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (engl. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
<i>Gnaz</i>	guanine nucleotide binding protein, alpha z subunit

H ₂ O	Wasser
IEG	immediate early gene
in vitro	lat. im Glas
ipRGC	intrinsisch photosensitive retinale Ganglienzellen (engl. = intrinsically photosensitive retinal ganglion cells)
l	Liter
LD	Licht/Dunkel 12:12
Limbus cornae	Kornealrand
lux	Beleuchtungsstärke
M	Mol pro Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mRNA	engl. messengerRNA
MT ₁	Melatonin-Rezeptor Typ 1
MT ₂	Melatonin-Rezeptor Typ 2
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanmol pro Liter
<i>Npas</i>	neuronal PAS domain-containing protein
<i>Nr1d1</i>	nuclear receptor subfamily 1 group D member 1, auch <i>Rev-Erba</i>
<i>Nr2e3</i>	nuclear receptor subfamily 2 group E member 3
<i>Nr4a1</i>	nuclear receptor subfamily 4 group A member 1, auch <i>Ngfib</i>
NSC	Nucleus suprachiasmaticus
NTC	engl. no template control
o. g.	oben genannt
<i>Opn4</i>	Opsin 4, Melanopsin
<i>Opn5</i>	Opsin 5, Neuroopsin
PAS	Period-Arnt-single-minded
PCR	engl. polymerase chain reaction
<i>Per1, Per2, Per3</i>	period circadian clock 1, 2, 3
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
<i>Rdh12</i>	retinol dehydrogenase 12
<i>Rev-Erb</i>	siehe <i>Nr1d1</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNAse	Ribonuklease
<i>Rora</i>	RAR-related orphan receptor alpha
<i>Rorβ</i>	RAR-related orphan receptor beta
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RRE/RORE	REV-ERB/ROR response element
s	Sekunde
SEM	Standardfehler
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem

VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZT	Zeitgeber time

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die molekulare Grundlage der Rhythmus­erzeugung der zirkadianen Uhr	5
Abbildung 2: Ablauf der qPCR	23
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Cosinormodells	26
Abbildung 4: Auszug der tageszeitlichen Profile der mRNA-Menge ausgewählter Gene in der Retina junger Mäuse (70 Tage) unter LD 12:12	30
Abbildung 5: Auszug der tageszeitlichen Profile der mRNA-Menge ausgewählter Gene in der Retina alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12	33
Abbildung 6: Auszug der durchschnittlichen Genexpression ausgewählter Gene in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12	36
Abbildung 7: Auszug der tageszeitlichen Profile der mRNA-Menge ausgewählter Gene in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12	39
Abbildung 8: Weitere tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina junger Mäuse (70 Tage) unter LD 12:12.....	XXVII
Abbildung 9: Weitere tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12.....	XXIX
Abbildung 10: Weitere Graphen der durchschnittlichen Genexpression in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12	XXXII
Abbildung 11: Weitere tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12	XXXIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der für die Versuche verwendeten allgemeinen Materialien	17
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Geräte zur Durchführung der Versuche	17
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits	18
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primer mit Sequenz und Produktlänge	19
Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur reversen Transkription	21
Tabelle 6: Zusammensetzung des Mastermixes zur qPCR.....	22
Tabelle 7: Statistische Analyse der in Abbildung 4 dargestellten tageszeitlichen Genprofile für die Retina junger Mäuse (70 Tage) unter LD 12:12	29
Tabelle 8: Statistische Analyse der in Abbildung 5 dargestellten tageszeitlichen Genprofile für die Retina alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12	32
Tabelle 9: Mann-Whitney-U-Test der über den 24-Stunden-Zyklus gemittelten mRNA-Mengen junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) für die Retina unter LD 12:12	35
Tabelle 10: Statistische Auswertung des Vergleichs der in Abbildung 7 dargestellten tageszeitlichen Genprofile für die Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12.....	38
Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der Befunde aus den Ergebnissen in Kapitel 4	43

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

1.1 Einleitung

Lebewesen zeigen einen Rhythmus vieler verschiedener biologischer Funktionen (1). Diese Periodizität wird nicht passiv, sondern aktiv durch ein endogenes System aus Uhren erzeugt (1, 2). Bei Säugetieren ist dieses System hierarchisch aufgebaut – mit einer sog. Meisteruhr im Nucleus suprachiasmaticus (NSC) des Hypothalamus und dieser Meisteruhr untergeordneten peripheren Uhren in vielen weiteren Geweben und Organen (3-5). Die Uhren erlauben Lebewesen die Antizipation und Anpassung an tageszeitliche Veränderungen der Umgebungsbedingungen. Auch ohne Taktgeber der Umgebung persistiert die Rhythmik der Uhren mit einer Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden, weshalb diese als „zirkadian“ (aus dem lat. circa diem: etwa ein Tag) bezeichnet werden (6, 7). Zur Einstellung der Rhythmik zirkadianer Uhren auf die tatsächliche Zeit und eine Periodenlänge von exakt 24 Stunden sind verschiedene Einflüsse aus der Umgebung verantwortlich, die als „Zeitgeber“ bezeichnet werden. Ein wichtiger Zeitgeber für die Meisteruhr im NSC des Hypothalamus ist der Wechsel zwischen Licht und Dunkel (3, 6, 8, 9). Als einziges lichtperzeptives Organ spielt die Retina eine wichtige Rolle bei der Synchronisierung des endogenen Uhrensystems (8, 10). Interessanterweise enthält auch die Retina selbst zirkadiane Uhren, die in verschiedenen Zelltypen (Zapfen, Stäbchen, dopaminerge Amakrinzellen, Ganglienzellen und Müller-Zellen) lokalisiert sind (11-13) und für die Adaptation der Retina an tageszeitlich wechselnde Lichtbedingungen verantwortlich sind (14, 15). So induzieren die retinalen Uhren tageszeitliche Veränderungen z. B. hinsichtlich des Sehprozesses mit Anpassung der Kontrastsensitivität und der Kopplung von Stäbchen und Zapfen (1, 16-19) sowie Erneuerung der Photorezeptoren (14, 15, 20-22) oder hinsichtlich der Botenstoffe Melatonin und Dopamin (1, 19, 23, 24).

1.2 Ziel der Dissertation

Grundlage der zirkadianen Uhren sind transkriptionelle Rückkopplungsschleifen zwischen Uhrengenen (3, 12, 25), welche über uhrenkontrollierte Effektorgene die Physiologie des Organismus auf tageszeitliche Wechsel in der Umgebung vorbereiten (2, 7, 9, 26). Die Retina enthält eine eigene, von der Meisteruhr im NSC unabhängige Uhr (11, 27, 28). Diese antizipiert die Anpassung der Retina an die sich im Tagesverlauf ändernden Lichtbedingungen (1, 8, 14, 15). Im Organismus kommt es im Alter zu Veränderungen, die auch die zirkadiane Uhr im NSC und das zirkadiane System betreffen (29, 30). So kommt es im Alter zu Veränderungen des tageszeitlichen Aktivitätsrhythmus (31-34) und einer Reduktion der Amplitude des Outputsignals der Meisteruhr des NSC (29, 34-37).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Alters auf die Expression und die tageszeitlichen Profile verschiedener retinaler Gene untersucht. Dabei wurde auf Gene fokussiert, die in früheren Studien einen tageszeitlichen Rhythmus der Expression zeigten und für das zirkadiane System und die Physiologie der Retina von Relevanz sind (1, 13, 19, 38). Hierdurch sollte analysiert werden, inwieweit auch die zirkadiane Uhr der Retina und die von ihr kontrollierten Effektorgene altersbedingten Veränderungen unterliegen. Zur Realisation dieser Zielsetzung wurden die tageszeitlichen Profile der Genexpression bei 70 Tage und 365 Tage alten Mäusen mittels quantitativer PCR verglichen und der Einfluss des Alters auf die tageszeitliche Rhythmik der Genexpression, die durchschnittliche Genexpression und die Amplitude und die Phase als Charakteristika zirkadianer Rhythmen untersucht.

2 Literaturdiskussion

Im folgenden Kapitel wird das zirkadiane System und der Einfluss des Alters auf dieses dargestellt. Zum Verständnis des Hintergrundes wird zunächst auf das zirkadiane System im Allgemeinen eingegangen. Anschließend wird die Lokalisation und funktionelle Bedeutung zirkadianer Uhren in der Retina erläutert. Abschließend wird der Einfluss des Alters auf das zirkadiane System im Allgemeinen und die Retina im Speziellen erörtert.

2.1 Der Aufbau des zirkadianen Systems

Tageszeitliche Rhythmen in Verhalten und Physiologie sind ein gemeinsames Merkmal lebender Systeme (1, 12). Diese Rhythmen entstehen nicht allein passiv durch zyklische Umweltveränderungen, sondern werden aktiv vom Organismus durch ein endogenes Uhrensystem erzeugt (1, 2, 6), das über Signale aus der Umgebung, sog. „Zeitgeber“, synchronisiert wird (2, 6). Das zirkadiane Uhrensystem ist hierarchisch organisiert (3, 4, 38). Im Gehirn, im paarigen Nucleus suprachiasmaticus (NSC) des Hypothalamus, befindet sich dabei der zentrale Taktgeber (3, 5, 39), der als sog. Meisteruhr die Uhren in den peripheren Geweben synchronisiert und so im gesamten Organismus eine koordinierte zirkadiane Rhythmik induziert (3, 25, 40-43).

Die molekulare Grundlage der endogenen Uhren sind die sog. Uhrengene und deren Proteinprodukte (25, 44, 45). Durch ineinandergreifende positive und negative Rückkopplungsschleifen auf Transkriptions- und Translationsebene werden rhythmische Expressionsmuster dieser Uhrengene erzeugt (Abbildung 1) (3, 12, 14, 19, 25, 40, 45).

Die Gene *Clock* und *Bmal1* kodieren für die basischen Helix-Loop-Helix Period-Arnt-single-minded ((bHLH)-PAS) Transkriptionsfaktoren und bilden die Grundlage der ersten Rückkopplungsschleife (12, 46). Die Proteinprodukte dieser beiden Gene heterodimerisieren zu einem Komplex (47). Dieser bindet an E-Box-Sequenzen mit der Sequenz CACGTG in Promotorregionen von Genen und aktiviert dadurch die Transkription dieser Gene (12, 46-52), insbesondere die der zwei *Period*-Gene *Per1* und *Per2* und der zwei *Cryptochrom*-Gene *Cry1* und *Cry2* (12, 26). Die Proteinprodukte dieser Gene bilden ebenfalls einen Heterodimer-Komplex und translozieren nach der Phosphorylierung des PER-Proteins durch die Caseinkinase I ϵ oder δ (CKI ϵ/δ) in den Zellkern (3, 19). Dort inhibieren sie ihre eigene Transkription, also fungieren sie als negative transkriptionelle Autoregulatoren (3, 19, 48, 53, 54).

Komponenten der zweiten Rückkopplungsschleife sind die Gene *Rev-Erb* und *Ror*, deren Transkription durch den CLOCK-BMAL1-Komplex ebenfalls über die Bindung an E-Box-Sequenzen initiiert wird (19, 55). Die Proteinprodukte regulieren nach ihrer

Translokation in den Zellkern die Transkription von *Bmal1*. Dies geschieht über die kompetitive Bindung an die Rev-Erb/Ror response element (RORE)-Bindungsstelle in der Promotorregion des Gens (55-59). Dabei aktiviert ROR die Transkription, während REV-ERB diese inhibiert (55-57, 60).

Eine zusätzliche Schleife im grundlegenden molekularen Mechanismus der Rhythmus erzeugung bildet das Gen *Dec1*, welches als Transkriptionsfaktor die CLOCK-BMAL1-vermittelte Aktivierung des *Per1*-Promotors unterdrückt (61-63) und so in die CLOCK-BMAL1-Schleife eingreift (62, 64). Als *Clock*-Homolog bildet das Gen *Npas*, welches zur Familie der basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren (65) gehört, einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor BMAL1 (66) und kann die Funktion des Uhrenproteins CLOCK sowohl in der zirkadianen Uhr im NSC als auch in peripheren Geweben ersetzen (66-68).

Die Transkription der sog. uhrenkontrollierten Gene (CCGs, clock controlled genes) wird ebenfalls durch den CLOCK-BMAL1-Komplex kontrolliert (26). Durch Bindung dieses Komplexes an die in den Promotorregionen der jeweiligen Gene enthaltenen E-Box-Sequenzen wird ihre Transkription initiiert (12, 69).

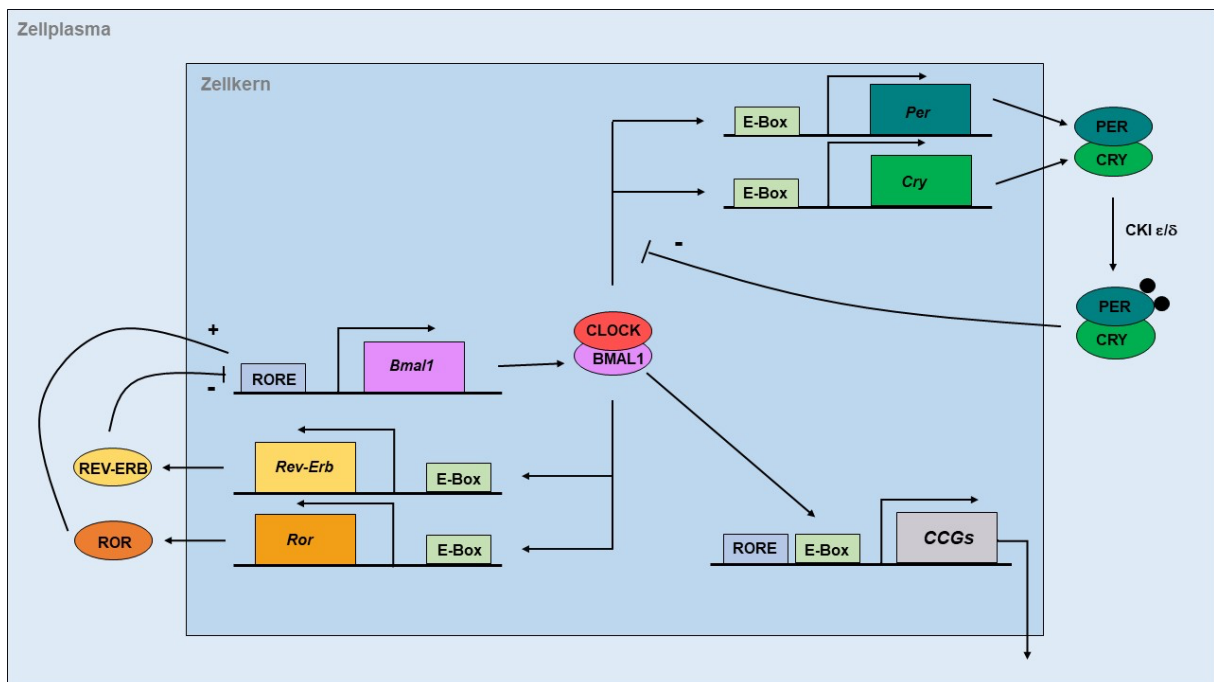


Abbildung 1: Die molekulare Grundlage der Rhythmuserzeugung der zirkadianen Uhr

Die erste Rückkopplungsschleife entsteht durch die Aktivierung der Transkription der *Per*- und *Cry*-Gene durch Bindung des CLOCK-BMAL1-Komplexes an E-Box-Sequenzen in ihren Promotorregionen. Die Proteinprodukte heterodimerisieren, das PER-Protein wird durch die CKI ϵ/δ phosphoryliert und der Komplex transloziert aus dem Zellplasma in den Zellkern. Dort inhibiert dieser Komplex die eigene durch CLOCK und BMAL1 vermittelte Transkription. In der zweiten Rückkopplungsschleife wird die Transkription der Gene *Rev-Erb* und *Ror* durch die Bindung des CLOCK-BMAL1-Komplexes an E-Box-Sequenzen in ihren Promotorregionen initiiert. Die entstehenden Proteinprodukte konkurrieren um die Bindung an die RORE innerhalb der Promotorregion des *Bmal1*-Gens, mit folgender Aktivierung durch ROR und Hemmung durch REV-ERB. Der CLOCK-BMAL1-Komplex aktiviert außerdem die Transkription uhrenkontrollierter Gene (CCGs, Clock controlled genes) über Bindung an die in den Promotoren enthaltenen E-Box-Sequenzen.

Abbildung in Anlehnung an: Felder-Schmittbuhl M-P, Buhr ED, Dkhissi-Benyahya O, et al. Ocular clocks: adapting mechanisms for eye functions and health. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:4856–4870. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24957> (19)

2.2 Entrainment des zirkadianen Uhrensystems

Wie bereits erwähnt, leitet sich der Begriff „zirkadian“ von dem lateinischen Begriff „*circa diem*“ ab und lässt sich übersetzen mit „ungefähr ein Tag“ (6, 7, 25, 70, 71). Endogene zirkadiane Rhythmen schwingen ohne Signale aus der Umgebung in diesem Sinne mit einer Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden (6, 9, 25, 40, 70-72). Um die Rhythmik in exakten zeitlichen Einklang mit der Umgebung zu bringen und sie auf eine Periodenlänge von genau 24 Stunden einzustellen, müssen die Oszillatoren an ihre Umwelt angepasst werden. Die für die Anpassung der Uhr relevanten Einflüsse aus der Umgebung werden als „Zeitgeber“ bezeichnet (2, 6, 7, 9, 25, 70, 72).

Ein starker Zeitgeber der Meisteruhr im NSC ist Licht bzw. der Wechsel zwischen Licht und Dunkelheit (3, 6-9, 72). Die Retina als lichtperzeptives Gewebe spielt bei der Synchronisierung von Rhythmen an die äußeren Lichtbedingungen eine bedeutende Rolle und vermittelt die Lichtinformation aus der Umgebung an die zirkadiane Uhr im NSC (8, 10, 72). Daran beteiligt ist eine Subpopulation spezieller retinaler Ganglienzellen, die intrinsisch photosensitiven retinalen Ganglienzellen (ipRGC) (9, 73, 74). Diese exprimieren das Photopigment Melanopsin mit einem tageszeitlichen Rhythmus (1, 7, 75-77) und sind lichtperzeptiv (78-81). Ihre Axone bilden den Tractus retinohypothalamicus (9, 72, 82, 83), der u. a. im NSC endet (76, 79, 84). Mehrere Autoren haben beobachtet, dass das zirkadiane Photoentrainment des Verhaltens bei Tieren mit Melanopsin-Defizienz und gleichzeitiger Degeneration der klassischen Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) verhindert ist (85, 86). Das Entrainment der zirkadianen Uhr im NSC beruht also sowohl auf den klassischen Photorezeptoren als auch den Melanopsin-enthaltenden ipRGCs (79, 87, 88).

Die Vermutung, dass auch die ipRGCs und Melanopsin an der Synchronisierung der retinalen Uhren beteiligt sind (89), wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Melanopsin zur Aufrechterhaltung der Uhrengenenexpression erforderlich zu sein scheint (89). Eine Defizienz des Gens *Opn4*, das für Melanopsin kodiert (75), verhindert in der Retina die lichtabhängige Induktion der Gene *Per1* und *Per2* (89) sowie die zirkadiane Regulation der Uhrengene *Bmal1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-Erba* und *Rorβ* (89).

Das lokale Entrainment der retinalen Uhren scheint aber auch von dem des NSC verschieden zu sein. So wurde gezeigt, dass die Retinae von Tieren mit einer *Opn4*-Defizienz und degenerierten Photorezeptoren – Bedingungen, unter denen das Entrainment im NSC verhindert ist – weiterhin eine zirkadiane Rhythmik aufweisen und an die Lichtbedingungen der Umgebung synchronisiert werden können (87). Daher sind für die Synchronisierung der Retina an äußere Lichtbedingungen weder Stäbchen und Zapfen noch Melanopsin zwingend erforderlich (87).

Vielmehr scheint eine weitere Subpopulation retinaler Ganglienzellen, die das für das Photopigment Neuropsin kodierende Gen *Opn5* exprimieren (90-95), für die Synchronisierung der retinalen Uhren verantwortlich zu sein (90). So verhindert eine Defizienz des Gens *Opn5* die Anpassung der Retina an die Licht-Dunkel-Zyklen der Umgebung (90). Über die Rolle von Neuropsin beim Entrainment der zentralen zirkadianen Uhr im NSC gibt es widersprüchliche Befunde. So wird die Relevanz des Gens für die Synchronisation des NSC durch einige Befunde in Frage gestellt und durch andere unterstützt (85, 86, 90). Gegen eine Beteiligung der *Opn5*-exprimierenden Neurone an der Synchronisation des NSC spricht, dass diese nicht zum NSC, sondern zu anderen Hirnregionen projizieren (93, 96).

Ebenfalls am Entrainment beteiligt sind immediate early Gene, zu denen u. a. die Gene *c-Fos*, *Egr1* und *Nr4a1* gehören. Im NSC wird die Expression dieser Gene durch bestimmte Reize, wie z. B. Licht, induziert (97-101). Auch in der Retina verändern Lichtimpulse die Genexpression der immediate early Gene, dabei variiert die Reaktion in den unterschiedlichen Zelltypen mit einer Induktion der Genexpression in der inneren Retina und den Ganglienzellen (102-104). Die Proteine der immediate early Gene fungieren als Transkriptionsfaktoren für unterschiedliche physiologisch relevante Gene (97, 104) und scheinen gemeinsam mit anderen Faktoren die Anpassung der Uhr an Lichtreize zu vermitteln (105-107).

2.3 Uhrengene als Transkriptionsfaktoren

Wie schon dargestellt fungieren die Komponenten der zirkadianen Uhr – die Uhrengene – als Transkriptionsfaktoren. Dies ermöglicht eine Kontrolle der retinalen Physiologie über die uhrenabhängige Regulation der Transkription von Effektorgenen (12, 69, 108), z. B. über die Bindung von CLOCK und BMAL1 an E-Box-Sequenzen in den Promotoren der Effektorgene (69, 109-111). Die Proteinprodukte dieser Effektorgene sind Teil zahlreicher physiologischer Vorgänge (26, 69). Viele dieser Proteine fungieren wiederum als Transkriptionsfaktoren (*c-Fos*, *Dbp*, *Dec1*, *E4bp4*, *Egr1*, *Npas*, *Nr1d1*, *Nr2e3*, *Nr4a1*, *Rorβ*) und regulieren so die Genexpression weiterer Gene (61, 62, 65, 66, 110, 112-120).

Das Gen *Dbp*, welches direkt durch CLOCK bzw. die zirkadiane Uhr kontrolliert wird (110, 111), kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von solchen Genen reguliert, die an Entgiftungs- und Metabolismusprozessen beteiligt sind (112, 121, 122). Die Aktivierung der Genexpression bewirkt DBP über eine D-Box-Sequenz in den Promotoren der jeweiligen Gene (113, 114). Diese Promotoraktivierung wird durch die kompetitive Bindung des Transkriptionsfaktors E4BP4, kodiert durch das Gen *E4bp4*, an die D-Box-Sequenz unterdrückt (113-115).

An der Regulation der Phototransduktion und der Erhaltung der Photorezeptoren ist der Transkriptionsfaktor *Nr2e3* durch Regulation der Expression von photorezeptorspezifischen Genen und Photopigmenten beteiligt (118, 123-125). Dieser spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung der Photorezeptoren (123-125). Eine ähnliche Aufgabe hat der Transkriptionsfaktor *Rorβ* (119, 120, 126, 127). *Rorβ* spielt in der Retina außerdem eine wichtige Rolle bei der Funktionsfähigkeit der Photorezeptoren, indem es den Aufbau der lichtrezeptiven Außensegmente reguliert, wodurch die Lichtsensitivität der Photorezeptoren sichergestellt wird (119, 120).

Ebenfalls an der Phototransduktion beteiligt sind die uhrenkontrollierten Gene *Arr1* und *Arr4*, deren Proteinprodukte die Aktivität von Opsinen in den Photorezeptoren beenden (128, 129), indem sie G-Protein-vermittelte intrazelluläre Signalwege unterbrechen (130-132).

Andere Proteinprodukte uhrenkontrollierter Gene sind Rezeptoren, über die z. B. Neurohormone ihren Einfluss auf die zirkadiane Uhr und die Retina ausüben. Das Gen *Drd4* kodiert für den Dopamin-Rezeptor 4 (D4-Rezeptor) (133). Über diesen Rezeptor beeinflusst Dopamin das Neurohormon Melatonin (133, 134) und nimmt über eine Regulation der Stäbchen-Zapfen-Kopplung (16-18) und der Kontrastsensitivität (23, 135) Einfluss auf die Lichtadaptation der Photorezeptoren (18, 23, 135). Über Dopamin und D4-Rezeptoren scheint das uhrenkontrollierte Effektorgen *Gnaz* die zirkadiane Uhr mit G-Protein-vermittelten Signalwegen zu verbinden (136).

Für Enzyme kodierende Gene können ebenfalls uhrenkontrolliert sein, wie z. B. die Gene *Rdh12*, *Cpt1a* und *Acadm*. *Rdh12* kodiert für die Retinoldehydrogenase 12, die an der Wiederherstellung des für den Sehprozess benötigten Chromophors 11-*cis*-retinal beteiligt ist (137-140). Die Proteinprodukte der Gene *Cpt1a* und *Acadm* wirken als Enzyme in der β -Oxidation von Fettsäuren (141-143).

Die Gene *c-Fos*, *Egr1* und *Nr4a1* üben neben ihrer Funktion als immediate early Gene und in diesem Rahmen als Vermittler des Entrainments weitere Aufgaben aus. *Egr1* ist an der Regulation der rhythmischen Erneuerung der Stäbchen-Außensegmente beteiligt (20, 144, 145), während *c-Fos* und *Nr4a1* die retinale Reaktion auf potentiell schädliche Reize, wie z. B. Licht oder Stress, beeinflussen (99, 146-150).

2.4 Das zirkadiane System der Retina

In diesem Kapitel wird das zirkadiane System innerhalb der Retina beleuchtet. Es wird zunächst auf die Lokalisation der zirkadianen Uhren in der Retina eingegangen, dann werden die molekularen Mechanismen dieser Uhren erläutert und anschließend wird der Einfluss dieser auf die Retina und ihre physiologischen Prozesse dargestellt.

2.4.1 Die zirkadianen Uhren in der Retina

Licht ist der stärkste Zeitgeber für das zirkadiane System (3, 6, 8) und die Retina vermittelt bei Säugern als einziges lichtperzeptives Organ die Lichtinformation an die Meisteruhr im NSC (8, 10, 72). Unabhängig von ihrer Rolle als Komponente des zirkadianen Systems besitzt die Retina ein organeigenes Netzwerk aus zirkadianen Uhren. Dieses erlaubt ihr die Anpassung an den tageszeitlichen Wechsel der Lichtintensität (0,1 bis 100.000 Lux) (1, 9, 15).

Die Existenz eigener Uhren in der Retina lässt sich aufgrund verschiedener Befunde postulieren (12, 27, 28). So folgt die Melatoninausschüttung in der Säugetierretina einer tageszeitlichen Rhythmik, welche *in vitro* sowie unter Dauerdunkel für mehrere Zyklen erhalten bleibt (11, 151). Gleichzeitig folgt auch die Transkription des Gens *Aanat*, das für das Schlüsselenzym in der Melatoninsynthese kodiert, einer tageszeitlichen Rhythmik (28, 152, 153). Diese bleibt unter Dauerdunkel erhalten (28, 152), was auf die Regulation durch eine zirkadiane Uhr hinweist (12, 28). Bemerkenswerterweise persistiert der tageszeitliche Rhythmus der *Aanat*-Expression auch nach Läsion des NSC-Gewebes. Dies lässt vermuten, dass die zirkadiane Rhythmik der Retina unabhängig von der Meisteruhr ist (14, 27).

In unterschiedlichen retinalen Zelltypen werden Uhrengene exprimiert (12, 13, 42, 47, 154). Daher wird vermutet, dass verschiedene Zelltypen der Retina zirkadiane Uhren besitzen (12, 19, 108, 151, 155, 156). So könnten Photorezeptoren zirkadiane Uhren enthalten (153, 155, 156), da in diesen Zellen das Gen *Aanat* sowie dessen Proteinprodukte ein rhythmisches Expressionsmuster zeigen (152, 153, 157, 158) und der Rhythmus der Melatoninsynthese auch unter Dauerdunkel für einige Zyklen erhalten bleibt (155). Die Uhrengenenexpression in Photorezeptoren wird allerdings kontrovers diskutiert (12). Die Studien einiger Autoren zeigen eine rhythmische Expression von Uhrengenen (38, 47, 89, 155), während andere Untersuchungen diese nicht nachweisen konnten (154, 159-161). Eine weitere Studie lässt vermuten, dass Photorezeptoren zwar einige Uhrengene exprimieren, aber in diesen Zellen keine koordinierte Expression aller sechs Hauptuhrengene (*Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock* und *Bmal1*) zu finden ist (154). Eine zirkadiane Expression der Uhrengene wurde dabei vor allem in den Zapfen und weniger in den Stäbchen lokalisiert (13).

Auch Zellen der inneren Retina exprimieren Uhrgene und deren Proteinprodukte (13, 47, 154, 159, 160). Deren Rhythmik persistiert sowohl *in vitro* als auch nach Entfernung der Photorezeptoren (154), sodass sie unabhängig von der Meisteruhr im NSC sowie von den Photorezeptoren zu sein scheint (154, 160).

Die gleichzeitige Expression der wichtigsten Uhrgene wurde insbesondere in einer Subpopulation dopaminerger Amakrinzellen beobachtet (13, 154, 159, 161, 162). Dies weist auf die Existenz einer Uhr in den amakrinen Zellen hin (1, 154, 161). Diese könnte für den zirkadianen Rhythmus der Dopaminfreisetzung verantwortlich sein (154, 160, 162).

Es wird außerdem vermutet, dass retinale Ganglienzellen eine zirkadiane Uhr besitzen, da auch in diesen Zellen Uhrgene exprimiert werden (1, 13, 154, 159). In einer Subpopulation der Ganglienzellen, den intrinsisch photosensitiven retinalen Ganglienzellen (ipRGC), zeigt das Gen *Opn4*, das für das Photopigment Melanopsin kodiert (75), eine tageszeitliche Rhythmik (1, 75, 77).

Weiterer Expressionsort der Uhrgene sind retinale Müller-Zellen (163). Da diese zu den Gliazellen gehören (164) lässt dieser Befund vermuten, dass zirkadiane Uhren nicht nur in den Neuronen, sondern auch in den Gliazellen der Retina vorkommen (164-167).

2.4.2 Der Einfluss der zirkadianen Uhr auf die Retina

Im Folgenden wird diskutiert, über welche Wege die zirkadianen Uhren der Retina wirksam werden. Dazu wird die Rolle der beiden Botenstoffe Melatonin und Dopamin beleuchtet. Anschließend wird der Einfluss der zirkadianen Uhr auf die Photorezeptoren und damit die Verarbeitung optischer Signale erläutert.

2.4.2.1 Melatonin und Dopamin

Die zirkadianen Uhren der Retina regulieren die tageszeitliche Adaptation über die Hormone Melatonin und Dopamin (1, 8, 24). Die Neurohormone spielen dabei gegensätzliche Rollen, mit Melatonin als humoralem Signal der Nacht und Dopamin als Signal für den Tag (1, 12, 14, 18, 42, 155, 168, 169). Gleichzeitig beeinflussen sich Dopamin und Melatonin gegenseitig in ihrer Synthese und Ausschüttung (1, 12, 24). Diejenigen Zellen, die die Hormone synthetisieren und freisetzen, bilden eine zelluläre Rückkopplungsschleife zur Regulation der zirkadianen Physiologie der Retina (1, 8, 12, 24, 156). Dabei inhibiert Melatonin die Freisetzung von Dopamin durch Wirkung über die Melatonin-Rezeptoren, Dopamin wiederum inhibiert die Melatoninsynthese und -freisetzung in den Photorezeptoren über den Dopaminrezeptor D4 (1, 8, 12, 18, 24, 133).

Melatonin wird ausschließlich in den Photorezeptoren gebildet (14, 152, 153, 155). Das limitierende Enzym der Melatoninsynthese ist die Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (AANAT), deren kodierendes Gen als uhrenkontrolliertes Gen direkt von der zirkadianen Uhr über eine E-Box-Sequenz in der Promotorregion reguliert wird (15, 109). Entsprechend folgen die AANAT-Aktivität und die Ausschüttung von Melatonin einem zirkadianen Rhythmus mit nächtlichem Maximum (14, 158). Die Wirkung als lokaler Neuromodulator erfolgt über zwei Typen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, den Melatonin-Rezeptor Typ 1 (MT₁) und den Melatonin-Rezeptor Typ 2 (MT₂) (14, 24, 170). Diese bilden zur Aktivierung nachfolgender Signalwege Heterodimer-Komplexe (170, 171). MT₁- und MT₂-Rezeptoren werden in Photorezeptoren und in der inneren Retina exprimiert (170-173). Über diese Rezeptoren vermittelt Melatonin die Adaptation der retinalen Physiologie an die Dunkelheit bzw. Nacht (12, 24). Dies geschieht u. a. durch Erhöhung der Lichtsensitivität der Retina (172), insbesondere auf Ebene der Stäbchen und nachgeschalteter Horizontalzellen (174-176). Außerdem inhibiert das Neurohormon über diese Rezeptoren die Dopaminfreisetzung (18, 177). Dabei moduliert Melatonin den zirkadianen Rhythmus der Dopaminausschüttung (18, 156, 178, 179), da der Dopamingehalt in melatoninprofizienten Mausstämmen einen Rhythmus zeigt (178), welcher bei Melatonindefizienz entfällt (178) und durch tägliche Melatonininjektionen wieder hergestellt werden kann (178).

Dopamin wird in der inneren Retina von dopaminergen amakrinen Zellen freigesetzt (180, 181). Als Neurohormon der Lichtadaptation wird der maximale Wert des Dopamingehalts am Tag erreicht (1, 17, 18, 179). Die Dopaminsynthese und -ausschüttung werden durch Licht und durch die retinale zirkadiane Uhr reguliert (19, 23), wobei Licht die Dopaminsynthese stimuliert (179, 180). Die Wirkung von Dopamin wird über verschiedene Typen von G-Protein-gekoppelten Dopamin D-Rezeptoren vermittelt (181, 182). Diese sind in der gesamten Retina nachweisbar, u. a. auch in Photorezeptoren (1, 134, 183). Durch Aktivierung der D4-Rezeptoren vermittelt Dopamin die Lichtadaptation der Photorezeptoren (18, 23, 135, 181), indem es die Kontrastsensitivität (23, 135) und die Kopplung von Stäbchen und Zapfen reguliert (16-18). Ebenfalls über diesen Rezeptor erfolgt eine Inhibition der Melatoninsynthese (133, 134, 184, 185). Andererseits scheint Dopamin für den Rhythmus der *Aanat*-mRNA nicht essentiell zu sein, da bei Unterbrechung der dopaminergen Signalwege und in der isolierten Photorezeptorschicht der Rhythmus erhalten bleibt (155, 156). Es kommt aber nach Entfernung der inneren Retina zu einer Verschiebung des *Aanat*-mRNA-Rhythmus, sodass Dopamin das „Phasing“ des Rhythmus zu beeinflussen scheint (18, 156).

2.4.2.2 Einfluss auf die Photorezeptoren

Eine Vielzahl physiologischer Vorgänge wird in der Retina durch die zirkadiane Uhr kontrolliert (1, 14, 15, 154). Dadurch wird die Anpassung an die sich tageszeitlich ändernde Umwelt ermöglicht (12, 14, 15). Für das Sehen ist insbesondere die Anpassung an die tageszeitlich wechselnden Lichtbedingungen der Umgebung von Bedeutung (1, 12, 14, 19). Daher werden sowohl die Aufnahme als auch die Verarbeitung optischer Signale zirkadian reguliert (12, 16, 186). Dies spiegelt sich im Elektroretinogramm (ERG) wider, das einen tageszeitlichen Rhythmus, insb. der B-Wellen-Amplitude, zeigt (1, 186-188). Gegenstand dieser zirkadianen Kontrolle sind u. a. die Photorezeptoren. Durch die zirkadiane Regulation der Stäbchen-Zapfen-Kopplung werden die Stäbchen als Photorezeptoren in der Nacht und die Zapfen als Photorezeptoren am Tag genutzt (1, 16, 17, 19). Auch die Erneuerung der Außensegmente der Photorezeptoren, in denen die Photopigmente liegen, erfolgt zirkadian (20, 189, 190). Dabei werden die Außensegmente der Zapfen zu Beginn der Dunkelphase (21) und die der Stäbchen zu Beginn der Lichtphase erneuert (20, 21, 191). Die Photopigmente selbst werden im Rahmen der visuellen Adaptation ebenfalls durch die retinale zirkadiane Uhr kontrolliert (22, 192), wie z. B. die Expression von Iodopsin (22), UV-Opisin und Rhodopsin (192).

2.5 Der Einfluss des Alters auf das zirkadiane System

Mit zunehmendem Alter treten im zirkadianen System Veränderungen auf (29, 30), die mit einer verminderten Funktion des zirkadianen Systems assoziiert zu sein scheinen (29, 34, 35). So kommt es bei verschiedenen Tiermodellen im Alter zu einer Reduktion der Amplitude zahlreicher zirkadianer Rhythmen (35), wie z. B. des tageszeitlichen Aktivitätsrhythmus (29, 31-34, 36, 193, 194). Weiter kommt es zu Störungen des Schlaf-Wach-Zyklus und des Rhythmus der Nahrungsaufnahme (31, 37, 195, 196). Hierbei kommt es zu Abweichungen der Periodenlänge von Rhythmen (32-34, 197, 198) sowie zu einer veränderten Synchronisierung der Rhythmik durch Zeitgeber aus der Umgebung (33, 198-201).

Das zirkadiane System kann in vier Abschnitte aufgeteilt werden, den Input ins zirkadiane System bzw. zur Uhr im NSC, die molekulare Uhr im NSC selbst, den Output der Uhr des NSC und die peripheren Uhren. Alle Abschnitte erfahren mit zunehmendem Alter Veränderungen, die im Folgenden näher beleuchtet werden (202).

2.5.1 Der Einfluss des Alters auf den Inputweg ins zirkadiane System

Licht ist der stärkste Zeitgeber des zirkadianen Systems (6, 7, 9). Das Auge unterliegt im Alter zahlreichen Veränderungen, die die Wirksamkeit von Licht als Zeitgeber abschwächen könnten. So kommt es beispielsweise zu einer verminderten Lichtübertragung von Linse und Pupille (199, 203) und insbesondere zu einer Reduktion der Anzahl retinaler photosensitiver Ganglienzellen (30, 204, 205).

2.5.2 Der Einfluss des Alters auf die Uhr im Nucleus suprachiasmaticus

Dass die Meisteruhr im NSC eine wichtige Rolle bei altersbedingten Veränderungen des zirkadianen Systems spielt, wird durch den Befund unterstützt, dass abgeschwächte zirkadiane Rhythmen, wie z. B. eine verminderte Reaktion auf phasenverschiebende Stimuli oder verzögerte lichtinduzierte Expression von *c-Fos* sowie die Körpertemperatur, lokomotorische Aktivität oder auch Flüssigkeitsaufnahme, durch die Implantation fetalen NSC-Gewebes in den dritten Ventrikel zumindest teilweise wiederhergestellt werden konnten (206-209). Veränderungen der zirkadianen Uhr sind auf physiologischer, zellulärer und molekularer Ebene sichtbar und betreffen darüber hinaus die Interaktion der Schrittmacherzellen auf der Netzwerk-Ebene (210). Diese wirken sich allesamt auf die Synchronisierung und die Funktion des NSC aus und resultieren im verminderten Output-Signal der zirkadianen Uhr (202, 211).

Auf zellulärer Ebene kommt es zu modifizierten elektrischen Eigenschaften der NSC-Neuronen, die u. a. zu einer Abnahme der Amplitude des elektrischen Aktivitätsrhythmus führen (36, 37, 212-216).

Die molekulare Ebene der zirkadianen Uhr ist ebenfalls im Alter verändert (200, 210, 211, 217). Dies trifft insbesondere das Uhrgen *Bmal1* (29, 34, 217), während das Expressionsprofil von *Per1* keine Veränderung aufweist (29, 34, 200, 218, 219). Für die Uhrgene *Per2*, *Clock*, *Cry1* und *Cry2* zeigen verschiedene Studien unterschiedliche Ergebnisse (29, 34, 200, 211, 218). Hierbei könnte der Einfluss des Alters auf das Expressionsmuster von *Per2* von der Spezies abhängen. So zeigen Ratten und Hamster keinen altersabhängigen Effekt (34, 210, 218), während Mäuse einen solchen aufweisen (36, 200, 220).

Die Anzahl der Neurone des NSC bleibt mit zunehmendem Alter konstant und kann deshalb als Ursache der abgeschwächten Funktion des neuronalen Netzwerks des NSC ausgeschlossen werden (31, 221-224). Allerdings tritt eine selektive Verringerung der Zahl von Neuronen auf (223, 225, 226), die sich durch die Expression des Hormons Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und des Vasopressinrezeptors V1a auszeichnen (226-229). Da diese Peptide eine wichtige Rolle für die Synchronisierung der einzelnen Neuronen des NSC spielen (230-233), könnte im Alter eine verringerte Expression von VIP und dem Vasopressinrezeptor V1a für die verminderte Synchronisierung der Neurone des NSC und damit für die verringerte Rhythmizität verantwortlich sein. Ebenfalls von Bedeutung für die Synchronisierung individueller Neurone des NSC ist der Neurotransmitter GABA (234, 235). Da auch im GABAergen System des NSC im Alter Veränderungen auftreten (236, 237), könnte auch dies zur Desynchronisierung und reduzierten Rhythmik der Meisteruhr beitragen (37, 202, 220).

Besonders betroffen vom Alter sind die Mechanismen, die der Synchronisierung an äußere Umgebungsbedingungen zugrunde liegen. So ist die Fähigkeit zur Synchronisierung an einige Zeitgeber mit dem Alter zunehmend eingeschränkt (201, 210, 238-241) und die Empfindlichkeit gegenüber dem wichtigsten Zeitgeber des zirkadianen Systems, dem Licht, vermindert (211, 238, 239, 241, 242). Eine Hypothese für die Ursache der verminderten Funktion der Uhr im NSC ist daher, dass die mit dem Alter eingeschränkte Synchronisierung durch den Zeitgeber Licht zu einer Desynchronisierung der Zellen im NSC und damit zu einer verminderten Funktion als Taktgeber führt (202). Eine mögliche Ursache dieser eingeschränkten Reaktion auf Lichtreize ist die verringerte Lichtinduktion bzw. eine erhöhte Schwelle für die Induktion des immediate early Gens *c-Fos* (30, 238, 239, 243).

2.5.3 Der Einfluss des Alters auf die Outputwege der zirkadianen Uhr im NSC

Die tageszeitliche Rhythmik der elektrischen Aktivität ist ein wichtiges Ausgangssignal des NSC und zeigt mit dem Alter eine reduzierte Amplitude (36, 37, 213, 214, 244). Als Ursache dieser Veränderung wird eine verminderte Kopplung und damit verminderte Synchronität der einzelnen NSC-Neurone postuliert (37, 202, 245). Folge der beschriebenen altersbedingten Veränderungen des NSC ist eine erhöhte Variabilität der Rhythmen mit Zellen in unterschiedlichen Phasen im NSC und in peripheren zirkadianen Uhren (202, 245, 246).

2.5.4 Der Einfluss des Alters auf die zirkadiane Uhr der Retina

In den peripheren zirkadianen Uhren treten ebenfalls altersbedingte Veränderungen auf (201, 219). In der Retina konnte mithilfe des Luciferase-Reporter-Gen-Assays gezeigt werden, dass für die *Per2*-Rhythmik im Alter eine Verminderung der Amplitude, eine Verlängerung der Periode und ein Phasenvorschub auftritt (247). Auf funktioneller Ebene zeigen sich mit zunehmendem Alter Veränderungen des Elektroretinogramms (ERG). So nimmt der tägliche Rhythmus des ERGs ab (248-251), sodass der tageszeitliche Verlauf der optischen Signalverarbeitung im Alter verändert zu sein scheint (248, 251).

Auf zellulärer und morphologischer Ebene treten mit dem Alter ebenfalls Veränderungen auf. So verringert sich die Zahl der Stäbchen, Zapfen und retinalen Ganglienzellen (251-255) sowie die Dicke der Retina (252).

Interessanterweise scheinen Störungen von Uhrengenen den Alterungsprozess der Retina zu beeinträchtigen. So kommt es z. B. bei einer Defizienz des Uhrengens *Bmal1* mit zunehmendem Alter zu einer Verringerung der Zapfenanzahl sowie Störungen der Photorezeptor-Signalwege und bei einer Defizienz des Uhrengens *Clock* im Alter zu einer Reduktion der Dicke der Photorezeptorschicht (247, 249, 256).

Um altersabhängige Veränderungen von zirkadianen Uhren und die daraus resultierenden Folgen für den Organismus besser verstehen zu können, wurde im Folgenden am Beispiel der Retina der Maus untersucht, inwieweit das tageszeitliche Profil der retinalen Uhrengenenexpression zwischen jungen und alten Mäusen variiert.

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt und die angewandten Methoden beschrieben.

3.1 Material

Nachfolgend werden die in den Versuchen verwendeten Materialien sowie die Firmen, von denen diese bezogen wurden, aufgeführt. In Tabelle 1 werden allgemeine Materialien genannt. Die Geräte, welche in den Analysen zum Einsatz kamen, werden in Tabelle 2 aufgeführt. Außerdem werden die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der für die Versuche verwendeten allgemeinen Materialien

Materialien	Firma
PCR-Folie	Bio-RAD Laboratories, Inc., USA
PCR-Mikropipettierplatte	Bio-RAD Laboratories, Inc., USA
Pipetten	Brand GmbH & Co. KG, Deutschland Labnet International, Inc., USA
Pipettenspitzen mit Filter	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Deutschland Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Tubes/Reaktionsgefäße	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Deutschland

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Geräte zur Durchführung der Versuche

Geräte	Firma
Gefrierschrank, -20 °C	Siemens AG, Deutschland
Gefriertruhe, -80 °C	Panasonic K.K., Japan
Heizblock mit Schüttler: ThermoShaker	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Horizontales Elektrophorese-System	VWR International, LLC, USA
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr-International S.A., Schweiz
Photometer: NanoDrop 2000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
qPCR-Gerät: CFX96TM	Bio-RAD Laboratories, Inc., USA
qPCR-Gerät: CFX ConnectTM	Bio-RAD Laboratories, Inc., USA
Thermocycler: PEQStar 96 Universal	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Ultraschallgeräte: Sonopuls	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland
UV-Lampe: VWR GenoView	VWR International, LLC, USA
Vortexer: Vortexgenie® 2	Scientific Industries, Inc., USA
Waage	Sartorius AG, Deutschland
Zentrifuge: Heraeus Labofuge 400R	Heraeus Holding GmbH, Deutschland
Zentrifuge: Heraeus Pico 17	Heraeus Holding GmbH, Deutschland

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalien, Reagenzien, Kits	Firma
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
DEPC-H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
DNase I (RNase-Free DNase Set)	Qiagen N.V., Niederlande
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
GelRed	Biotium, Inc., USA
GeneRuler Low Range DNA Ladder (100 bp)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Isopropanol	AppliChem GmbH, Deutschland
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-RAD Laboratories, Inc., USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen N.V., Niederlande
RDD-Puffer	Qiagen N.V., Niederlande
RNA-Extraktion: RNeasy® Mikro Kit	Qiagen N.V., Niederlande
Rnase free Dnase Set	Qiagen N.V., Niederlande
RT: Verso cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Salzsäure	Merck KGaA, Deutschland
Tris-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

3.1.1 Primer

Die zur Bestimmung der Transkriptmenge verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt. Diese wurden mit der Software Clone Manager Suite 7 (Sci-Ed, USA) kreiert und von der Firma Eurofins (Luxemburg) bezogen.

Die lyophilisierten Primer wurden nach Angaben des Herstellers mit Tris-EDTA-Puffer (=TE-Puffer; 10mM Tris und 1mM EDTA ad 1l Aqua dest; pH 7,8) auf eine Konzentration von 100 μ M eingestellt und bei -20°C gelagert. Vor Verwendung erfolgt die weitere Verdünnung der Primer im Verhältnis 1:10 mit TE-Puffer.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primer mit Sequenz und Produktlänge

Gen	NCBI-Code (Genbank-ID)	Sequenz 5' nach 3'	Länge des Amplikons [bp]
<i>18S</i>	NR_003278.3	F: TCAACACGGGAAACCTCAC R: TCGCTCCACCAACTAAGAAC	110
<i>Acadm</i>	NM_007382.5	F: TACCCGTTCCCTCTCATC R: CCCATACGCCAACTCTTC	129
<i>Arr1</i>	NM_009118.2	F: ATCAAGGAGGGCATCGAC R: TCGGTAGCCACTTCACTG	116
<i>Arr4</i>	NM_133205.3	F: ACCAATCTGGCCTCTAGC R: GCTCCACACCAACATCAC	148
<i>c-Fos</i>	NM_010234.3	F: CTTGGAGCCAGTCAAGAG R: TAGAAGGAACCGGACAGG	141
<i>Cpt1a</i>	NM_013495.2	F: GCCATCTGTGGGAGTATGTC R: TGTAGCCTGGTGGGTTTG	112
<i>Dbp</i>	NM_016974.3	F: GGAGGTGCTAATGACCTTTG R: GGACTTTCCTTGCCTTCTC	146
<i>Dec1</i>	NM_011498.4	F: CACAGACAGTGGCTATGG R: GGGCTCTTCGGATTCTTG	136
<i>Drd4</i>	NM_007878.3	F: GTTGGACGCCTTTCTTCG R: GTTGAGGGCACTGTTGAC	116
<i>E4bp4</i>	NM_017373.3	F: AAGTGGAGGCTTTGGACAG R: ACCCGAGGTTCCATGTTTC	107
<i>Egr1</i>	NM_007913.5	F: CCCTTCCAGTGTGCAATC R: CACTCCTGGCAAACCTCC	127
<i>Gnaz</i>	NM_010311.3	F: GGTCTACATCCAACGTCAGTTC R: TCTGTCACTGCGTCAAACAC	123
<i>Gapdh</i>	BC082592.1	F: GTCATCCCAGAGCTGAAC R: CTCAGATGCCTGCTTCAC	144
<i>Npas</i>	NM_008719	F: TCTCAGAGGCAGCTTGAAC R: ATGGCAGGGTCTTGAAGG	136
<i>Nr1d1</i>	NM_145434	F: CTGCATCATCGTCATCCTCTTC R: ACAGTAGCACCATGCCATTC	150
<i>Nr2e3</i>	NM_013708	F: GCCCTGGTCCTCTTCAAAC R: GGTGGTGAGCCTTGCTATG	112
<i>Nr4a1</i>	NM_010444	F: TGATGTTCCCGCCTTTGC R: GCCATGTGCTCCTTCAGAC	126
<i>Per1</i>	NM_011065.5	F: CCAGATTGGTGGAGGTTACTGAGT R: GCGAGAGTCTTCTTGGAGCAGTAG	92
<i>Per2</i>	AF036893.1	F: AGTGGCAAGATTCAAACCAAAGT R: TGAAAGCTGTCACCACCATAGAA	120
<i>Per3</i>	NM_011067.2	F: CCGCCCCTACAGTCAGAAAG R: GCCCCACGTGCTTAAATCCT	100
<i>Rdh12</i>	NM_030017.4	F: CTCTTCTCACCTTCTTC R: GATACCCACATCCTCTTG	125
<i>Rorβ</i>	NM_001043354.2	F: CCTGGCTGATCGAACCAAG R: TGCAGACTGCCGTGATAG	146

3.2 Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden die Methoden der Versuche sowie der statistischen Analysen, welche im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurden, näher erläutert.

3.2.1 Versuchstiere

Zur Evaluierung altersabhängiger Veränderungen des zirkadianen Systems in der murinen Retina kamen insgesamt 64, zur Hälfte 70 Tage alte und zur Hälfte 365 Tage alte, männliche und weibliche Mäuse des Stammes C3H.C-Pde6b2H mit intakten Photorezeptoren ohne rd-Mutation zum Einsatz. Das verwendete Mausmodell zeichnet sich durch eine Melatonin-Profizienz aus und wurde von Dr. Russell G. Foster (Nuffield Laboratory of Ophthalmology and the Sleep and Circadian Neuroscience Institute, University of Oxford) zur Verfügung gestellt.

Die Tiere wurden in einem Lichtregime mit zwölf Stunden Licht und zwölf Stunden Dunkelheit (LD 12:12) unter standardisierten Bedingungen (200 Lux Beleuchtung am Tag, Rotlicht in der Nacht, Temperatur $20 \pm 1^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit 45% bis 65%, Futter und Wasser ad libitum) im Tierstall des Instituts für Anatomie (ehemals Institut für Funktionelle und Klinische Anatomie) der Universitätsmedizin Mainz gehalten. Die Zeitgeber Licht-an und Licht-aus sind definiert als Zeitgeber Zeit (ZT) 0 und ZT12.

Zur Analyse der rhythmischen Genexpression wurden die Mäuse in Drei-Stunden-Intervallen über den 24-stündigen LD12:12 Zyklus durch Dekapitation nach Anästhesie mit CO_2 geopfert und die Retinae entnommen.

Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach Maßgabe der Europäischen Union (Direktive 86/609/EEC). Die Tiere wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland gehalten und behandelt.

3.2.2 Entnahme der Retinae

Die Retinae wurden zu indizierten ZTs, nämlich ZT 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21, im Alter von 70 oder 365 Tagen entnommen. Dazu wurde mit einer Pinzette der Augapfel entnommen, dieser mit einem sterilen Skalpell am Limbus corneae eingeschnitten und nach Entfernung von Glaskörper und Linse wurde die Retina separiert. Anschließend wurden die entnommenen Retinae in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Die Entnahme der Retinae während der Dunkelphase erfolgte unter gedimmtem (< 5 Lux) Rotlicht.

3.2.3 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus den entnommenen Retinae erfolgte mithilfe des RNeasy® Micro Kits von Qiagen nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Zunächst wurde die für die Lyse der Gewebeproben benötigte Menge an Lysis-Puffer durch Mischung von RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 angesetzt. Die Proben (jeweils 2 Retinae pro Tube) wurden in 350 μ l Lyse-Puffer mithilfe von Ultraschall homogenisiert (60 Sekunden) und bei 17.000 g unter Raumtemperatur für drei Minuten zentrifugiert. Zu den homogenisierten Retinae wurden 350 μ l Ethanol (70%) hinzugegeben und das Gemisch nach Durchmischung auf Zentrifugensäulen mit Kieselgelmembran pipettiert. Diese wurden bei 8.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Nun folgte ein erster Waschschriff der gebundenen RNA mit 350 μ l RW1-Puffer und erneuter Zentrifugation bei 8.000 g für 15 Sekunden. Zum Verdau von kontaminierender DNA wurde ein Mix aus 10 μ l DNase I stock solution (1500 Kunitz Einheiten) und 70 μ l RDD-Puffer auf die Säulen pipettiert und die Proben für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten mehrere Waschschriffe. Zunächst mit 350 μ l RW1-Puffer, gefolgt von 500 μ l RPE-Puffer und jeweiliger anschließender Zentrifugation der Säulen bei 8.000 g für 15 Sekunden. Abschließend erfolgte die erneute Zugabe von 500 μ l RPE-Puffer zu den Proben und deren Zentrifugation bei 8.000 g für 2 Minuten. Zum Trocknen wurden die Säulen mit offenem Deckel für eine Minute bei 17.000 g zentrifugiert.

Zur Elution der gebundenen RNA wurden 30 μ l RNase-freies Wasser auf die Mitte der Säulen pipettiert, diese für fünf Minuten inkubiert und bei 17.000 g für eine Minute zentrifugiert. Hiernach wurde die RNA-Konzentration der Eluate mit einem Photometer (NanoDrop) gemessen und die extrahierte RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription der extrahierten RNA in cDNA wurden zunächst 400 ng RNA mit 9 μ l Reaktionsansatz (Tabelle 5) und RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l pipettiert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur reversen Transkription

Reagenzien	Volumen [μ l]
5fach Puffer	4,0
dnTP (0,5 mM)	1,8
Anchored dt-Primer (0,5 μ g/ μ l)	0,8
RT-Enhancer	0,8
Verso Enzyme Mix	0,8
H ₂ O (RNase-frei)	0,8

Zur eigentlichen Synthese der cDNA wurden die Proben zunächst auf 110 °C aufgeheizt und dann bei 42 °C für 30 min inkubiert. Die Terminierung der Reaktion erfolgte durch Erhitzen der Proben auf 95 °C für zwei Minuten. Parallel zu den Ansätzen wurden Negativ-Kontrollen (engl.: No Template Control, NTC) durch Durchführung der reversen Transkription ohne Zugabe von RNA hergestellt. Die cDNA-Proben wurden anschließend im Verhältnis 1:4 mit DNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zur Quantifizierung der Transkriptmenge in Abhängigkeit der Tageszeit und des Alters der Tiere kam die qPCR zum Einsatz. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Zur Durchführung der qPCR wurde ein Mastermix nach folgendem Schema (Tabelle 6) angesetzt:

Tabelle 6: Zusammensetzung des Mastermixes zur qPCR

Reagenzien	Volumen [µl]
H ₂ O	4,6
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	10,0
Forward-Primer (100nM)	0,2
Reverse-Primer (100nM)	0,2

In die Wells einer Mikropipettierplatte wurden 5 µl cDNA-Probe und 15 µl Mastermix pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit Folie versiegelt und bei 12.000 g für 1 min zentrifugiert. Die PCR-Amplifikation der Proben fand unter Verwendung des CFX96 Real-Time Systems (Bio-Rad) gemäß den folgenden PCR-Bedingungen statt:

Zunächst wurde die Mikropipettierplatte auf 95 °C aufgeheizt und es erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA zu einzelsträngiger DNA bei 95 °C für 5 Sekunden. Anschließend fand die Anlagerung der Primer an ihre Zielsequenz (Annealing) durch Abkühlung auf 60 °C statt. Es folgte die Elongation, während der die DNA durch die thermostabile Taq-Polymerase amplifiziert wurde. Zum Ende der Elongationsphase lag die DNA wieder doppelsträngig vor und der PCR-Zyklus bestehend aus Denaturierung, Annealing und Amplifikation wurde 44- Mal wiederholt (siehe Abbildung 2). Die Messung der Fluoreszenzsignale (aktivierter Farbstoff bei 530 nm) zur Quantifizierung der Transkriptmenge erfolgte in Doppelbestimmung am Ende eines jeden der 45 Zyklen. Zur Überprüfung der Reinheit der erhaltenen PCR-Produkte wurde am Ende der PCR-Reaktion eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, indem die Proben in 0,5 °C-Schritten von 65 °C auf 95 °C aufgeheizt wurden und die freiwerdende Fluoreszenz quantifiziert wurde (siehe Abbildung 2).

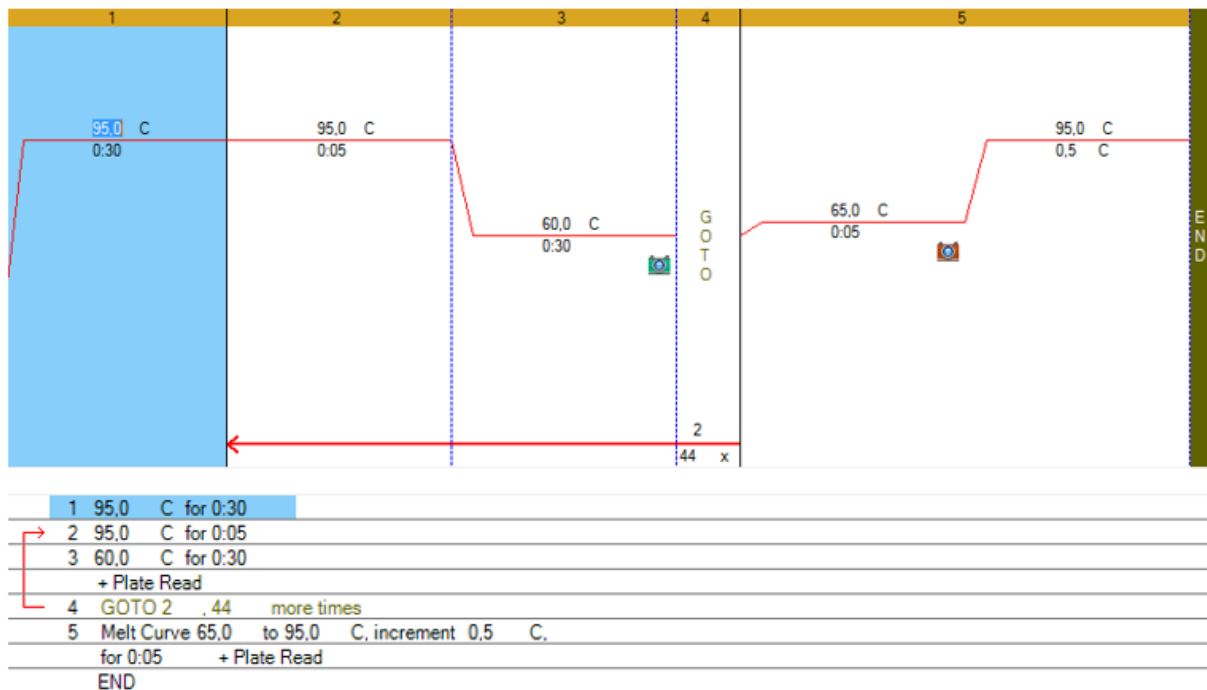


Abbildung 2: Ablauf der qPCR

Der Ablauf der in der Abbildung gezeigten qPCR ist im obigen Text beschrieben.

Unter Verwendung einer internen Standardkurve mit bekanntem cDNA-Gehalt (101 – 108 Kopien/ μ l) wurde die Transkriptmenge in den Proben anhand der gemessenen Schwellenwert-Zyklen (Ct-Werte) mit der Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software (Bio-Rad) berechnet.

Zur Herstellung der internen Standards wurden PCR-Produkte der verwendeten Primer (siehe Tabelle 4) mittels Agarose-Gelelektrophorese separiert. Hierfür wurde ein 2 %-iges Gel aus 100 ml 1xTAE-Puffer (=Tris-Acetat-EDTA Elektrophoresepuffer; 40 mM Tris, 20 mM Acetat und 1 mM EDTA ad 1l Aqua dest., pH 8,0) und 2 g Agarose hergestellt und mit 4 μ l pro 100 ml GelRed ergänzt. Die PCR-Amplikons der verwendeten Primer wurden im Verhältnis 1:5 mit TAE-Puffer gemischt, auf das Gel aufgetragen und bei 100 V für 40 min elektrophoretisch getrennt. Als Marker kamen 2,5 μ l 100 bp GeneRuler Low Range DNA Ladder der Firma Thermo Fisher Scientific zum Einsatz. Nach Auftrennung der Proben wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet und die Banden ausgeschnitten. So konnte zudem gezeigt werden, dass die PCR-Produkte der verwendeten Primer die vorhergesagte Größe aufweisen.

Zur Extraktion der DNA aus dem Gel kam das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers zum Einsatz. Infolgedessen wurde zu den Banden die dreifache Menge an QG-Puffer gegeben und die Proben unter konstanter Rotation (300 rpm) für zehn Minuten bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die einfache Menge an Isopropanol hinzugefügt und die Proben auf QIAquick Säulen gegeben. Diese wurden für eine Minute bei 17.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Es folgten zwei Waschschriffe. Dazu wurden die Säulen zunächst mit 500 µl QG-Puffer und danach mit 750 µl PE-Puffer versetzt, für 1 min bei 17.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Folgenden wurde die Elution der DNA mittels 30 µl EB-Puffer vorgenommen.

Die DNA-Konzentration der Eluate wurde mittels Photometer (NanoDrop) bestimmt.

Aus der DNA-Konzentration und der Fragmentlänge des Primer-Produkts (siehe Tabelle 4) wurde mit nachfolgender Formel die Anzahl an cDNA-Kopien im Eluat berechnet und auf einen Gehalt von 109 Kopien/µl eingestellt.

$$(number\ of\ copies = (amount \cdot 6,022 \cdot 10^{23}) / (length \cdot 1 \cdot 10^9 \cdot 650)).$$

Die Lösung mit der Kopienzahl von 109/µl wurde im Verhältnis 1:10 seriell mit DEPC-H₂O verdünnt und so die Standardreihe mit bekannter Anzahl an cDNA-Kopien eines Gens (108 bis 101 Kopien/µl) hergestellt.

3.2.6 Statistische Auswertung

In vier unabhängigen Versuchsreihen mit acht verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 32 Tiere für die beiden Altersstufen (70 und 365 Tage) untersucht, insgesamt also 64 Tiere. Die qPCR-Daten wurden dabei aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung gebildet und auf die Haushaltsgene *Gapdh* und *18S* normiert. Haushaltsgene werden in allen Zellen eines Organismus vergleichsweise stabil und unabhängig von externen Einflüssen exprimiert und sind essentiell für die Lebensfähigkeit der Zellen (257-259). *Gapdh* kodiert für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ein wichtiges Enzym im glykolytischen Stoffwechsel, und *18S* stellt eine ribosomale Untereinheit dar.

Zur Darstellung tageszeitlicher Unterschiede in der Genexpression wurde der Mittelwert der Transkriptmenge eines Gens an jedem Zeitpunkt relativ zum Durchschnitt der Transkriptmenge über alle acht Zeitpunkte berechnet. Damit beträgt der Mittelwert dieser Prozentsätze immer 100% und es entsteht eine Vergleichbarkeit der Diagramme. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die Normierung erfolgte mehrstufig. Zunächst wurde die durchschnittliche Konzentration μ_{HG} der Haushaltsgene pro Zeitpunkt (und den zwei Messungen) bestimmt, die als Referenzwerte dienen:

$$\mu_{HG}(t) = \frac{Gapdh_1(t) + Gapdh_2(t) + 18S_1(t) + 18S_2(t)}{4}$$

Pro Gen und pro Altersstufe wurde jeweils die gemessene Genkonzentration $K_i(t)$ (zum Zeitpunkt t und für die vier Experimente i) mit der mittleren Haushaltsgenkonzentration normiert und mit einem Normierungsfaktor (von einer Million) multipliziert:

$$N_i(t) = \frac{K_i(t)}{\mu_{HG}(t)} \cdot 1\,000\,000$$

Anschließend wurde der Mittelwert dieser Verhältnisse über die Zeitpunkte gebildet:

$$\bar{N}_i = \frac{\sum_t \bar{N}_i(t)}{8}$$

Danach wurde das Verhältnis zwischen gemessener Konzentration und durchschnittlicher Haushaltsgenkonzentration mit der mittleren Ausprägung dieser normiert:

$$\widehat{N}_i(t) = \frac{N_i(t)}{\bar{N}_i}$$

Abschließend wurde der Mittelwert pro Zeitpunkt über die Experimente i gebildet:

$$m(t) = \frac{\widehat{N}_1(t) + \widehat{N}_2(t) + \widehat{N}_3(t) + \widehat{N}_4(t)}{4}$$

Diese Werte $m(t)$ werden in den Diagrammen dargestellt.

Dieses Normierungsvorgehen bedingt zum einen, dass das natürliche Verhalten der Haushaltsgene berücksichtigt wird und zugleich, dass der Mittelwert der dargestellten Prozentsätze exakt 100 beträgt. Das führt zu einer besseren Vergleichbarkeit zwischen den untersuchten Genen.

Zur statistischen Analyse der erhaltenen Expressionsprofile kam zum einen die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und zum anderen die Cosinor-Analyse zum Einsatz. Mithilfe der einfaktoriellen ANOVA kann eine Aussage über einen statistisch auffälligen Einfluss der Zeit auf die Genexpression getroffen werden. Die ANOVA kann jedoch keine Aussage treffen, ob die Genexpression rhythmisch erfolgt (260). Um eine mögliche Periodizität in den Schwankungen der mRNA-Menge im 24-h-Expressionsprofil der Gene zu detektieren, wurde mithilfe der Cosinor-Analyse ein Modell durch Anpassung der erhobenen Daten an eine Cosinuskurve bestimmt (260-264).

Die Cosinor-Analyse erfolgte mit folgender Formel:

$$f(t) = A + B \cos [2 \pi (t + C) / T]$$

wobei:

- $f(t)$ = Relatives Expressionslevel eines Gens
- t = Zeitpunkt der Probennahme
- A = Durchschnittswert der Cosinuskurve, sog. Mesor (midline estimating statistic of rhythm)
- B = Amplitude
- C = Akrophase
- T = Periodenlänge, auf 24 Stunden festgelegt

Bei der Cosinoranalyse waren der Zeitpunkt der maximalen Genexpression (Akrophase), der Zeitpunkt der minimalen Genexpression (Bathyphase) und die Differenz der maximalen Auslenkungen (Amplitude) von besonderer Bedeutung. In der unten aufgeführten Abbildung (siehe Abbildung 3) wird das Cosinormodell mit seinen Variablen bildlich dargestellt.

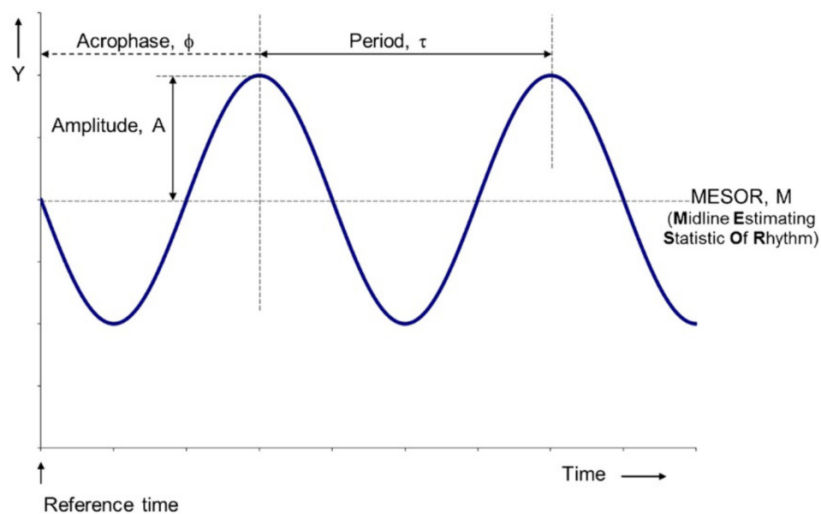


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Cosinormodells

Übernommen aus Cornelissen et al. 2014 (264).

Darüber hinaus wurde zur Beurteilung der Genexpression und der tageszeitlichen Genprofile zwischen den Versuchsgruppen (70 Tage versus 365 Tage) ein Vergleich von Cosinuskurven hinsichtlich der Amplituden und der Phasenverschiebung durchgeführt. Um einen signifikanten Unterschied in der durchschnittlichen Genexpression in beiden Altersstufen zu detektieren, erfolgte ein Mann-Whitney-U-Test.

Die statistischen Analysen wurden im Falle der ANOVA und der Cosinor-Analyse mit Microsoft Excel 2003 (Labor, Eintragen der Werte) und 365 (Analysen) und im Falle des Mann-Whitney-U-Tests und des Vergleichs der Cosinuskurven mit dem Cosinor Paket im Programm R 4.3.1 durchgeführt (265, 266). Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Es erfolgte keine Korrektur für multiples Testen, die p-Werte haben daher einen explorativen Charakter. Die Darstellung der qPCR-Daten über den LD12:12-Zyklus erfolgte ebenfalls mithilfe von Microsoft Excel 2003.

4 Ergebnisse

Mithilfe von qPCR wurden in Retinae von unterschiedlich alten Mäusen (70 und 365 Tage) die tageszeitlichen Profile der Transkriptmenge der Gene *Acadm*, *Arr1*, *Arr4*, *c-Fos*, *Cpt1a*, *Dbp*, *Dec1*, *Drd4*, *E4bp4*, *Egr1*, *Gnaz*, *Npas*, *Nr1d1*, *Nr2e3*, *Nr4a1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Rdh12* und *Rorβ* ermittelt. Die Datenerhebung erfolgte aus Retinaprobe von Mäusen aus einem Lichtregime mit Licht/Dunkel-12:12 (LD 12:12). Anschließend wurde analysiert, ob die untersuchten Gene tageszeitliche Schwankungen der mRNA-Menge aufweisen und ob die durchschnittliche absolute Genexpression und die tageszeitlichen Genprofile durch das Alter beeinflusst werden.

4.1 Genexpression und tageszeitliche Genprofile in der Retina unter LD 12:12 bei jungen Mäusen (70 Tage)

Im Alter von 70 Tagen zeigte die Mehrheit der untersuchten Gene (*Acadm*, *Arr1*, *Arr4*, *c-Fos*, *Cpt1a*, *Dbp*, *Dec1*, *Drd4*, *Egr1*, *Gnaz*, *Nr2e3*, *Nr4a1*, *Per1*, *Per2*, *Per3* und *Rdh12*) einen Einfluss der Zeit auf die Genexpression (ANOVA $p < 0,05$) (Tabelle 7 und Abbildung 4 sowie Abbildung 8 im Anhang). Die Cosinor-Analyse ergab für 60 % der Gene einen statistisch auffälligen Rhythmus der Expression (Cosinor $p < 0,05$). Dabei zeigte die Mehrheit der Gene ein Maximum in der Lichtphase. Zu dieser Gruppe gehören die Gene *Acadm* (Akrophase ZT 8,13), *Arr1* (Akrophase ZT 8,51), *Arr4* (Akrophase ZT 11,24), *Cpt1a* (Akrophase ZT 6,02), *Dbp* (Akrophase ZT 7,68), *Dec1* (Akrophase ZT 6,81), *Per1* (Akrophase ZT 8,39), *Per2* (Akrophase ZT 9,74), *Per3* (Akrophase ZT 8,18) und *Rdh12* (Akrophase ZT 8,71) (Tabelle 7 und Abbildung 4 sowie Abbildung 8 im Anhang). Zwei Gene zeigten ein Maximum in der Dunkelfase, nämlich *Drd4* (Akrophase ZT 20,39) und *Gnaz* (Akrophase ZT 19,84) (Tabelle 7 und Abbildung 4 sowie Abbildung 8 im Anhang). Die Gene *c-Fos*, *E4bp4*, *Egr1*, *Npas*, *Nr1d1*, *Nr2e3*, *Nr4a1* und *Rorβ* wiesen keine statistisch auffällige Rhythmik der Genexpression auf (Tabelle 7 und Abbildung 4 sowie Abbildung 8 im Anhang).

Bei einigen Genen (*c-Fos*, *Egr1*, *Nr2e3* und *Nr4a1*) konnte ein Einfluss der Zeit auf die Genexpression (ANOVA $p < 0,05$) bei fehlender statistisch auffälliger Rhythmik in der Cosinoranalyse (Cosinor $p \geq 0,05$) festgestellt werden (Tabelle 7 und Abbildung 4 sowie Abbildung 8 im Anhang). In diesen Fällen zeigt die Zeit einen Einfluss auf die Genexpression, die Steigung der Kurve ist also nicht 0, jedoch nicht im Sinne einer statistisch auffälligen Rhythmik.

Die in Abbildung 4 dargestellten tageszeitlichen Profile stellen einen Auszug der 20 untersuchten Gene dar und wurden aufgrund ihrer beispielhaften Muster ausgewählt. Die übrigen tageszeitlichen Profile in Abbildung 8 im Anhang sind den hier aufgeführten Beispielen

ähnlich. Die in Abbildung 4 gezeigten Profile der Gene *Arr4*, *c-Fos*, *Cpt1a* und *Nr4a1* zeigen sinusoidale Funktionen mit zum Teil $p < 0,05$ in der Cosinor-Analyse. Dabei sind die Funktionen der Gene *Arr4* und *Cpt1a* im Vergleich zu denen der Gene *c-Fos*, *Egr1* und *Nr4a1* in der Phase verschoben (Maximum in der Lichtphase versus in der Dunkelphase). Auffällig ist am Beispiel des Gens *Egr1*, dass die sinusoidale Modellfunktion während der Lichtphase negative Werte für die mRNA-Menge annimmt, was nicht der Realität entspricht (Genexpression ≥ 0). Das Gen *E4bp4* ist beispielhaft für fehlende Signifikanz in der ANOVA und Cosinor-Analyse mit $p > 0,05$.

Tabelle 7: Statistische Analyse der in Abbildung 4 dargestellten tageszeitlichen Genprofile für die Retina junger Mäuse (70 Tage) unter LD 12:12

Gen	ANOVA	Cosinor-Analyse		
	p-Wert	p-Wert	Akrophase [h]	Amplitude [%]
<i>Acadm</i>	<0,001	0,022	8,13	49,99
<i>Arr1</i>	<0,001	0,007	8,51	38,90
<i>Arr4</i>	<0,001	0,006	11,24	53,35
<i>c-Fos</i>	<0,001	0,078	15,17	66,28
<i>Cpt1a</i>	0,001	0,003	6,02	56,32
<i>Dbp</i>	<0,001	0,001	7,68	51,44
<i>Dec1</i>	0,041	0,003	6,81	26,59
<i>Drd4</i>	<0,001	0,029	20,39	33,98
<i>E4bp4</i>	0,346	0,848	20,19	3,50
<i>Egr1</i>	<0,001	0,225	14,96	109,51
<i>Gnaz</i>	0,036	0,039	19,84	21,58
<i>Npas</i>	0,182	0,193	1,10	10,37
<i>Nr1d1</i>	0,633	0,147	4,06	16,73
<i>Nr2e3</i>	<0,001	0,075	2,12	22,26
<i>Nr4a1</i>	<0,001	0,086	16,20	61,75
<i>Per1</i>	0,012	<0,001	8,39	45,41
<i>Per2</i>	<0,001	0,001	9,74	42,10
<i>Per3</i>	0,001	0,001	8,18	31,02
<i>Rdh12</i>	<0,001	0,010	8,71	36,10
<i>Rorβ</i>	0,419	0,656	19,90	5,40

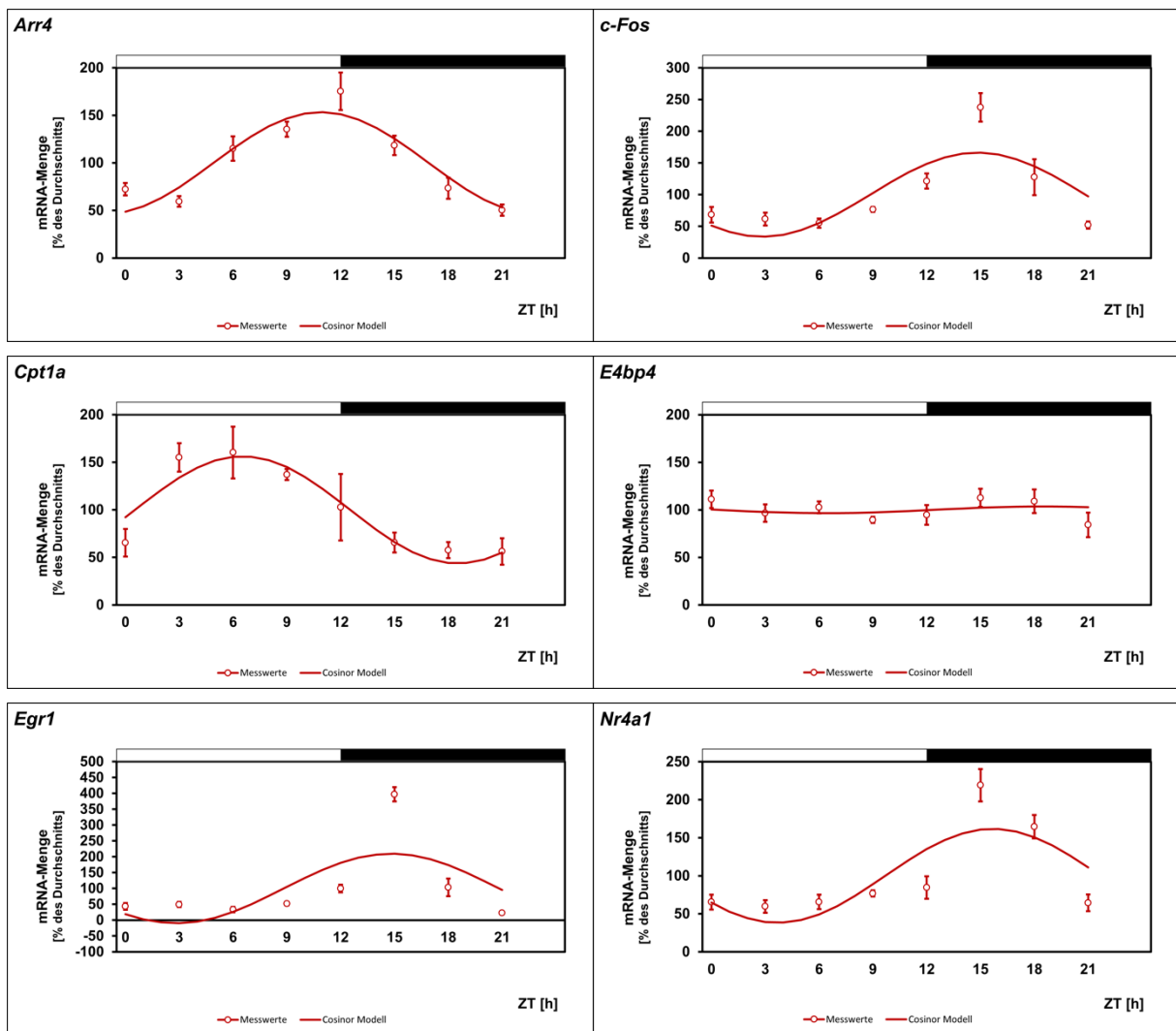


Abbildung 4: Auszug der tageszeitlichen Profile der mRNA-Menge ausgewählter Gene in der Retina junger Mäuse (70 Tage) unter LD 12:12

Es wird ein Auszug der Transkriptionsprofile der untersuchten Gene (6 von 20) dargestellt, welche mittels qPCR ermittelt wurden. Die übrigen Transkriptionsprofile der untersuchten Gene werden in Abbildung 8 im Anhang dargestellt.

Die mRNA-Menge wird als Funktion der Zeitgeber time (ZT) dargestellt. Die aus der Cosinor-Analyse errechnete sinusoidale Funktion wird als Linie dargestellt. Die Messwerte der Gene wurden mit dem Mittelwert der Transkriptmenge der Haushaltsgene *Gapdh* und *18S* normiert und als Prozentpunkte aufgetragen (siehe Kapitel 3.2.6). Die statistische Analyse der tageszeitlichen Profile wird in Tabelle 7 dargestellt. Jeder Wert entspricht einem Mittelwert \pm SEM aus $n = 4$ Versuchen. In den Abbildungen markiert der helle Balken die Lichtphase, der dunkle Balken markiert die Dunkelphase.

4.2 Genexpression und tageszeitliche Genprofile in der Retina unter LD 12:12 bei alten Mäusen (365 Tage)

Im Alter von 365 Tagen zeigte ebenfalls die Mehrzahl der untersuchten Gene (*Acadm*, *Arr1*, *Arr4*, *c-Fos*, *Cpt1a*, *Dbp*, *Dec1*, *Drd4*, *E4bp4*, *Egr1*, *Gnaz*, *Nr2e3*, *Nr4a1*, *Per3*, *Rdh12* und *Rorβ*) einen Einfluss der Zeit auf die Genexpression (ANOVA $p < 0,05$). Lediglich die Gene *Npas*, *Nr1d1*, *Per1* und *Per2* wiesen diesen Einfluss nicht auf (Tabelle 8 und Abbildung 5 sowie Abbildung 9 im Anhang).

Die Cosinor-Analyse zeigte bei der geringen Mehrheit einen statistisch auffälligen Rhythmus der Genexpression (Cosinor $p < 0,05$) mit einem Maximum in der Lichtphase für die Gene *Acadm* (Akrophase ZT 7,29), *Arr1* (Akrophase ZT 8,45), *Arr4* (Akrophase ZT 11,21), *Cpt1a* (Akrophase ZT 6,64), *Dbp* (Akrophase ZT 7,44), *Nr2e3* (Akrophase ZT 3,83) und *Rdh12* (Akrophase ZT 8,29) sowie einem Maximum in der Dunkelphase für die Gene *c-Fos* (Akrophase ZT 16,18), *Drd4* (Akrophase ZT 19,77), *Gnaz* (Akrophase ZT 18,26) und *Nr4a1* (Akrophase ZT 16,65) (Tabelle 8 und Abbildung 5 sowie Abbildung 9 im Anhang). Keine statistisch auffällige Rhythmik konnte bei den Genen *Dec1*, *E4bp4*, *Egr1*, *Npas*, *Nr1d1*, *Per1*, *Per2*, *Per3* und *Rorβ* festgestellt werden (Tabelle 8 und Abbildung 5 sowie Abbildung 9 im Anhang).

Bei 365 Tage alten Mäusen wiesen die Gene *Dec1*, *E4bp4*, *Egr1*, *Per3* und *Rorβ* einen Einfluss der Zeit auf die Genexpression auf (ANOVA $p < 0,05$), die Steigung der Genexpressionskurve ist also nicht 0. Dieser Einfluss der Zeit ist jedoch nicht im Sinne einer Cosinuskurve mit einem statistisch auffälligen Rhythmus assoziiert (Cosinor $p > 0,05$) (Tabelle 8 und Abbildung 5 sowie Abbildung 9 im Anhang).

Die in Abbildung 5 gezeigten tageszeitlichen Profile stellen wie im vorigen Unterkapitel eine Auswahl der 20 untersuchten Gene dar und wurden aufgrund ihrer beispielhaften Muster ausgewählt. Die übrigen tageszeitlichen Profile sind den hier aufgeführten ähnlich und in Abbildung 9 im Anhang dargestellt. Abbildung 5 zeigt die tageszeitlichen Profile der Gene *Arr4*, *c-Fos*, *Cpt1a* und *Nr4a1* mit sinusoidalen Funktionen und $p < 0,05$ in der Cosinor-Analyse. Die Funktionen der Gene *Arr4* und *Cpt1a* sind, wie auch bei 70 Tage alten Mäusen, gegenüber den Genen *c-Fos*, *Egr1* und *Nr4a1* in der Phase verschoben mit Maxima in der Lichtphase bei den erstgenannten Genen und Maxima in der Dunkelphase bei den zuletzt genannten Genen. Auch bei 365 Tage alten Mäusen ist die sinusoidale Modellfunktion für das Gen *Egr1* nur eingeschränkt realitätstreu aufgrund ebenfalls negativer Werte der mRNA-Menge während der Lichtphase. Ebenso ist auch bei älteren Mäusen das Gen *E4bp4* beispielhaft für eine fehlende Signifikanz in der ANOVA und Cosinor-Analyse mit $p > 0,05$ aufgeführt.

Tabelle 8: Statistische Analyse der in Abbildung 5 dargestellten tageszeitlichen Genprofile für die Retina alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12

Gen	ANOVA		Cosinor-Analyse	
	p-Wert	p-Wert	Akrophase [h]	Amplitude [%]
<i>Acadm</i>	0,001	<0,001	7,29	45,24
<i>Arr1</i>	<0,001	0,003	8,45	27,99
<i>Arr4</i>	<0,001	0,019	11,21	37,93
<i>c-Fos</i>	0,001	0,019	16,18	78,36
<i>Cpt1a</i>	0,001	0,014	6,64	41,76
<i>Dbp</i>	<0,001	0,001	7,44	39,68
<i>Dec1</i>	0,027	0,261	8,24	15,30
<i>Drd4</i>	<0,001	0,021	19,77	37,16
<i>E4bp4</i>	0,044	0,523	15,49	6,43
<i>Egr1</i>	<0,001	0,076	15,61	131,84
<i>Gnaz</i>	0,001	0,040	18,26	21,90
<i>Npas</i>	0,054	0,733	2,88	5,98
<i>Nr1d1</i>	0,206	0,248	7,01	16,99
<i>Nr2e3</i>	<0,001	0,041	3,83	26,35
<i>Nr4a1</i>	<0,001	0,031	16,65	85,05
<i>Per1</i>	0,143	0,097	8,63	21,91
<i>Per2</i>	0,182	0,474	9,30	10,83
<i>Per3</i>	0,001	0,410	7,55	11,38
<i>Rdh12</i>	<0,001	0,006	8,29	39,17
<i>Rorβ</i>	0,002	0,172	18,22	20,38

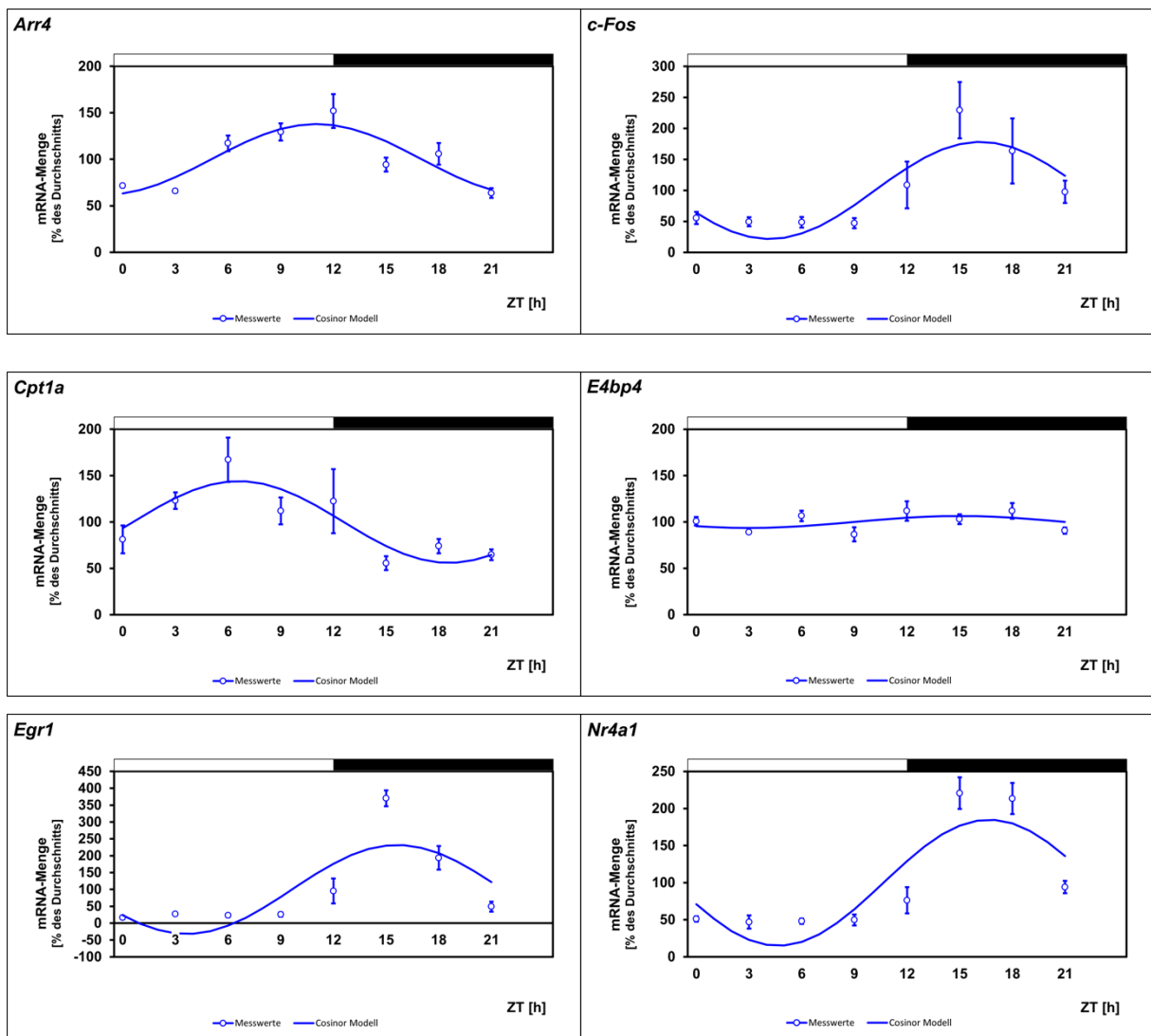


Abbildung 5: Auszug der tageszeitlichen Profile der mRNA-Menge ausgewählter Gene in der Retina alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12

Es wird ein Auszug der Transkriptionsprofile der untersuchten Gene (6 von 20) dargestellt, welche mittels qPCR ermittelt wurden. Die übrigen Transkriptionsprofile der untersuchten Gene werden in Abbildung 9 im Anhang dargestellt.

Die mRNA-Menge wird als Funktion der Zeitgeber time (ZT) dargestellt. Die aus der Cosinor-Analyse errechnete sinusoidale Funktion wird als Linie dargestellt. Die Messwerte der Gene wurden mit dem Mittelwert der Transkriptmenge der Haushaltsgene *Gapdh* und *18S* normiert und als Prozentpunkte aufgetragen (siehe Kapitel 3.2.6). Die statistische Analyse der tageszeitlichen Profile wird in Tabelle 8 dargestellt. Jeder Wert entspricht einem Mittelwert \pm SEM aus $n = 4$ Versuchen. In den Abbildungen markiert der helle Balken die Lichtphase, der dunkle Balken markiert die Dunkelphase.

4.3 Einfluss des Alters auf die durchschnittliche Genexpression

Zur Überprüfung eines relevanten Unterschieds der jeweiligen Genexpressionsmittelwerte zwischen 70 Tage alten und 365 Tage alten Mäusen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Dabei ergab sich für ein Fünftel der Gene, nämlich *Dec1*, *Gnaz*, *Npas* und *Rorβ*, ein Einfluss des Alters auf die durchschnittliche Genexpression (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,05$), während die Mehrheit der Gene keinen signifikanten Einfluss des Alters auf die durchschnittliche Genexpression aufwies (Mann-Whitney-U-Test $p > 0,05$) (siehe Tabelle 9). In Abbildung 6 wird ein Auszug der durchschnittlichen Genexpression der untersuchten Gene dargestellt, welche aufgrund ihres beispielhaften Musters ausgewählt wurden. Die übrigen Darstellungen der durchschnittlichen Genexpression sind den hier aufgeführten Beispielen ähnlich und werden in Abbildung 10 im Anhang gezeigt. Das Gen *Acadm* zeigt beispielhaft für einen Einfluss des Alters eine Zunahme der durchschnittlichen Genexpression mit dem Alter, jedoch ohne statistische Auffälligkeit bei $p > 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test. Die Gene *Arr1* und *Drd4* zeigen keine Signifikanz des Einflusses des Alters auf die durchschnittliche Genexpression, dabei ist der Median der Genexpression im Falle von *Arr1* in beiden Altersstufen ähnlich, in Falle von *Drd4* ist die durchschnittliche Genexpression im höheren Alter der Mäuse geringer. Das Gen *c-Fos* zeigt in der Darstellung der durchschnittlichen Genexpression insb. bei 70 Tage alten Mäusen viele im Diagramm als Punkte dargestellte Ausreißer.

Tabelle 9: Mann-Whitney-U-Test der über den 24-Stunden-Zyklus gemittelten mRNA-Mengen junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) für die Retina unter LD 12:12

Gen	Interaktion von Alter und durchschnittlicher Genexpression
	p-Wert
<i>Acadm</i>	0,734
<i>Arr1</i>	0,404
<i>Arr4</i>	0,115
<i>c-Fos</i>	0,484
<i>Cpt1a</i>	0,645
<i>Dbp</i>	0,367
<i>Dec1</i>	0,014
<i>Drd4</i>	0,054
<i>E4bp4</i>	0,125
<i>Egr1</i>	0,857
<i>Gnaz</i>	< 0,001
<i>Npas</i>	< 0,001
<i>Nr1d1</i>	0,103
<i>Nr2e3</i>	0,443
<i>Nr4a1</i>	0,313
<i>Per1</i>	1,000
<i>Per2</i>	0,475
<i>Per3</i>	0,476
<i>Rdh12</i>	0,090
<i>Rorβ</i>	0,001

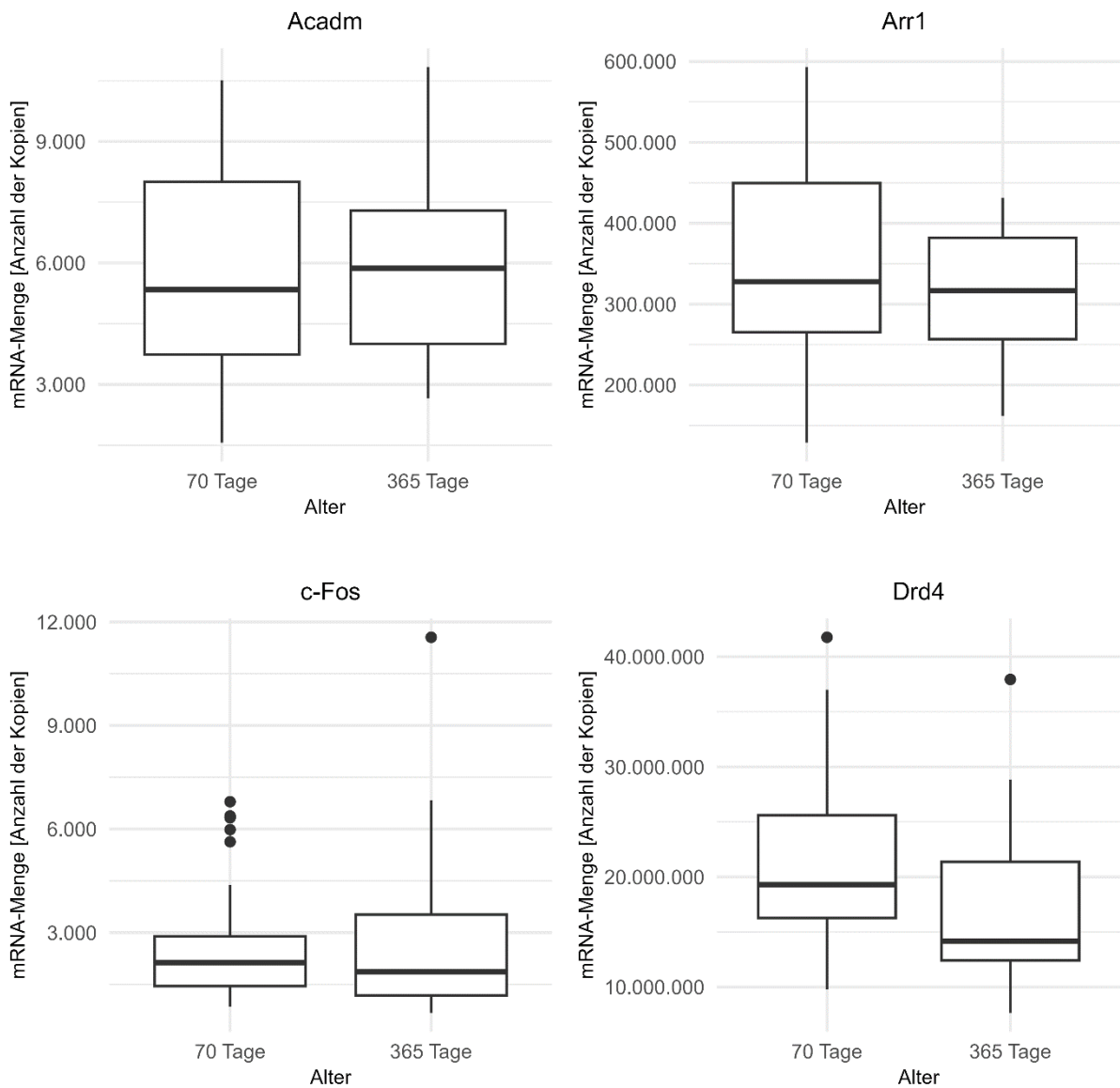


Abbildung 6: Auszug der durchschnittlichen Genexpression ausgewählter Gene in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12

Es wird ein Auszug der durchschnittlichen Genexpression der untersuchten Gene (4 von 20) dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen der Genexpression wurde die Skalierung der Achsen für die bessere Lesbarkeit an die Gene angepasst. Die übrigen Darstellungen der durchschnittlichen Genexpression werden in Abbildung 10 im Anhang gezeigt.

Die mRNA-Menge wird als Funktion des Alters (70 versus 365 Tage) dargestellt. Die ermittelten Daten wurden auf die Transkriptmenge der Haushaltsgene *Gapdh* und *18S* einfach normiert (siehe Formeln zu $N_i(t)$ aus Kapitel 3.2.6). Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen, die Linie in der Mitte der Box markiert den Median. Die Antennen stellen das maximal 1,5-Fache des Interquartilsabstands dar. Ausreißer werden als Punkte im Diagramm markiert. Die statistische Analyse der durchschnittlichen Genexpression wird in Tabelle 9 dargestellt.

4.4 Einfluss des Alters auf die tageszeitlichen Genprofile

Zum Vergleich der tageszeitlichen Profile der Gene zwischen den zwei untersuchten Altersstufen erfolgte die Darstellung eines jeden Gens für beide Altersstufen als sinusoidale Funktion. In der Folge werden diese Funktionen beider Altersstufen für jedes Gen verglichen.

Im Test auf Interaktion von Alter und Amplitude der tageszeitlichen Profile zeigte sich für vier Gene ein Einfluss des Alters auf die Amplitude ($p < 0,05$), und zwar für die Gene *Arr4*, *Dbp*, *Egr1* und *Per2* (Tabelle 10 und Abbildung 7 sowie Abbildung 11 im Anhang). Eine höhere Amplitude in einer Versuchsgruppe hat die Bedeutung einer höheren maximalen Genexpression in dieser Gruppe.

Die in Abbildung 7 dargestellten tageszeitlichen Genprofile 70 und 365 Tage alter Mäuse stellen einen Auszug der untersuchten Gene dar und wurden aufgrund ihrer beispielhaften Muster ausgewählt. Die übrigen tageszeitlichen Profile sind den hier aufgeführten Beispielen ähnlich und werden in Abbildung 11 im Anhang gezeigt. Den Einfluss des Alters auf die Amplitude zeigt beispielhaft das Gen *Arr4* und zwar findet sich eine größere mRNA-Menge mit höherer Amplitude bei den jüngeren (70 Tage alten) Mäusen. Am Beispiel der Gene *Nr4a1* und *Acadm* ist zu sehen, dass sich das Amplitudenverhältnis über den 24-Stunden-Zyklus verändern kann. Im Falle von *Nr4a1* zeigt sich zunächst eine höhere Amplitude des Genprofils junger (70 Tage alter) Mäuse. Im Verlauf während der Dunkelphase fällt ein Schnittpunkt der beiden Funktionen auf mit nachfolgend höherer Amplitude des Genprofils 365 Tage alter Mäuse. Diese beobachteten Veränderungen können im Fall des Gens *Nr4a1* jedoch Zufall sein, da die Tests auf Interaktion von Alter und Amplitude sowie Phase nicht signifikant sind ($p > 0,05$). Am Beispiel der Gene *Cpt1a* und *Drd4* zeigen sich Genprofile für die unterschiedlichen Altersstufen, welche eine ähnliche Phasenverschiebung aufweisen und sich lediglich in der Amplitude stärker unterscheiden. Die Gene *E4bp4* und *Per3* zeigen in ihren jeweiligen Genprofilen flache Kurvenverläufe mit wenig Veränderung der Amplitude über den Zeitverlauf. Im Unterschied hierzu kann beispielhaft am Gen *Rorb* gezeigt werden, dass sich die beiden Altersstufen in der Veränderung der Amplituden unterscheiden, mit weniger Änderung der Amplituden über den Zeitverlauf bei 70 Tage alten Mäusen und stärkerer Veränderung der Amplitude über den Verlauf bei den 365 Tage alten Mäusen.

Ein Einfluss des Alters auf die Phase konnte nur für das Gen *Acadm* nachgewiesen werden ($p < 0,05$) (Tabelle 10 und Abbildung 6 sowie Abbildung 11 im Anhang). Die anderen Gene wiesen keinen statistisch auffälligen Einfluss des Alters auf die Phase der Genexpression auf ($p > 0,05$) (Tabelle 10 und Abbildung 7 sowie Abbildung 11 im Anhang). Das bedeutet, dass das Alter bei der großen Mehrheit der untersuchten Gene zu keiner Verschiebung der Expressionskurve führt und Minimum sowie Maximum der Expression bei jungen und alten Versuchstieren zu einem ähnlichen Zeitpunkt erfolgen.

Tabelle 10: Statistische Auswertung des Vergleichs der in Abbildung 7 dargestellten tageszeitlichen Genprofile für die Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12

	Interaktion von Alter und Amplitude	Interaktion von Alter und Phase
Gen	p-Wert	p-Wert
<i>Acadm</i>	0,699	0,021
<i>Arr1</i>	0,062	0,362
<i>Arr4</i>	0,009	0,767
<i>c-Fos</i>	0,451	0,746
<i>Cpt1a</i>	0,165	0,566
<i>Dbp</i>	0,030	0,516
<i>Dec1</i>	0,069	0,992
<i>Drd4</i>	0,908	0,612
<i>E4bp4</i>	0,630	0,529
<i>Egr1</i>	0,031	0,768
<i>Gnaz</i>	0,591	0,675
<i>Npas</i>	0,351	0,765
<i>Nr1d1</i>	0,556	0,906
<i>Nr2e3</i>	0,951	0,734
<i>Nr4a1</i>	0,178	0,241
<i>Per1</i>	0,050	0,476
<i>Per2</i>	0,002	0,837
<i>Per3</i>	0,477	0,853
<i>Rdh12</i>	0,631	0,556
<i>Rorβ</i>	0,201	0,188

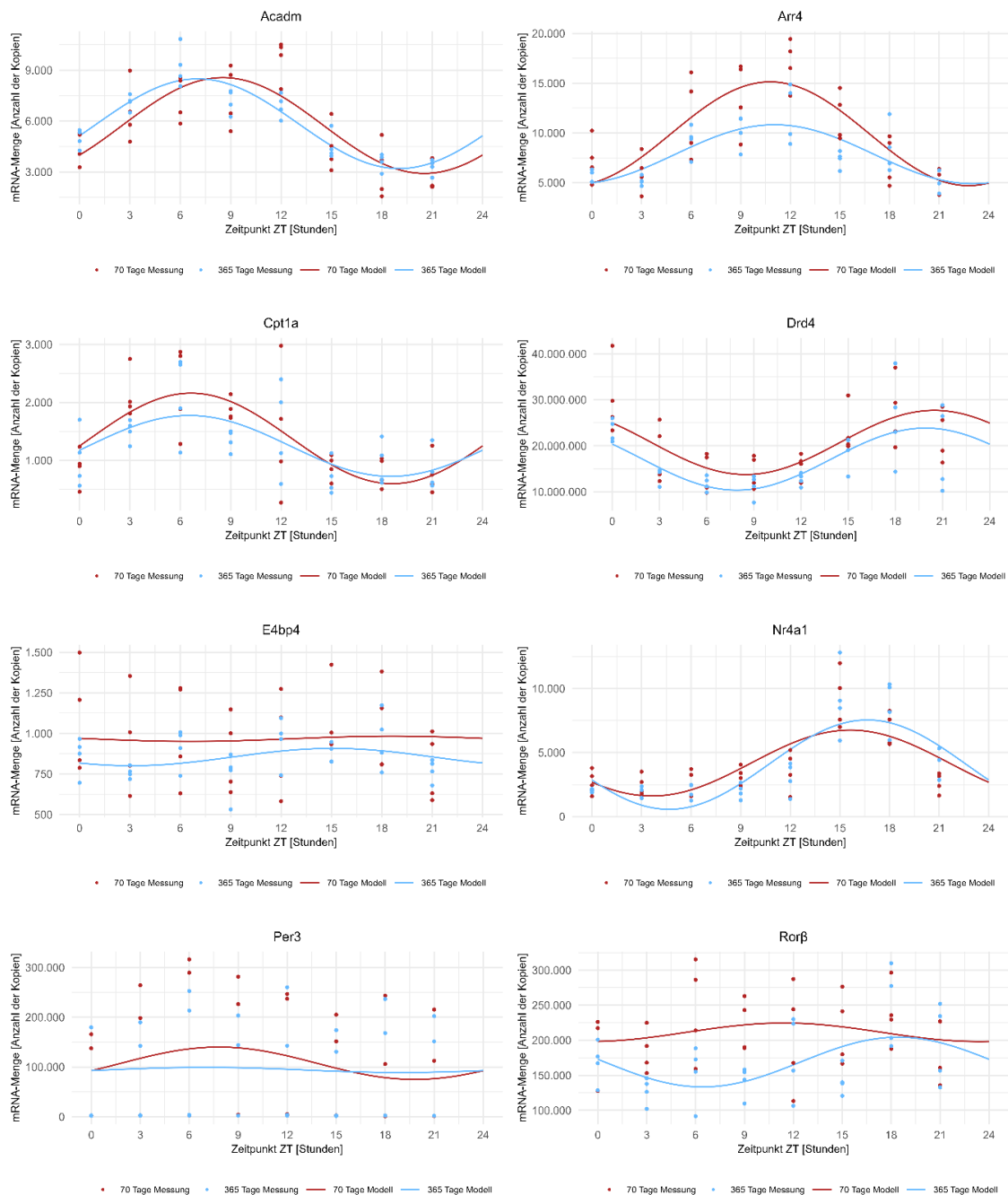


Abbildung 7: Auszug der tageszeitlichen Profile der mRNA-Menge ausgewählter Gene in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12

Es werden ausgewählte Transkriptionsprofile der untersuchten Gene (8 von 20) bei 70 Tage und 365 Tage alten Mäusen dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen der Genexpression wurde die Skalierung der Achsen für die bessere Lesbarkeit an die Gene angepasst. Die übrigen Transkriptionsprofile beider Altersgruppen werden in Abbildung 11 im Anhang dargestellt. Die mRNA-Menge wird als Funktion der Zeitgeber time (ZT) dargestellt. Die aus der Cosinor-Analyse errechnete sinusoidale Funktion wird als Linie dargestellt, die rote Linie stellt die sinusoidale Funktion für 70 Tage alte Mäuse und die blaue Linie für 365 Tage alte Mäuse dar. Die ermittelten Daten wurden auf die Transkriptmenge der Haushaltsgene *Gapdh* und *18S* normiert und als Prozent des Durchschnitts der Transkriptmenge der 24-stündigen Zeitperiode aufgetragen. Die statistische Analyse der tageszeitlichen Profile wird in Tabelle 1/Tabelle 10 dargestellt. Jeder Wert entspricht einem Mittelwert \pm SEM aus $n = 4$ Versuchen.

5 Diskussion

5.1 Versuchsaufbau

In der vorliegenden Arbeit wurden die Retinae von Mäusen unterschiedlichen Alters hinsichtlich der Genexpression verglichen. Hierbei wurde auf Gene mit postulierter tageszeitlicher Regulation fokussiert (1, 13, 19, 38). Für den Vergleich wurden 70 Tage alte Mäuse als „jung“ und 365 Tage alte Mäuse als „alt“ betrachtet (siehe Kapitel 3). Das Alter von Versuchstieren bzw. der Altersabstand zwischen den Versuchsgruppen junger und alter Mäuse unterscheidet sich in der Literatur teilweise deutlich. Unter 3 Monate alte Mäuse wurden als „jung“, 3 bis 6 Monate alte Tiere als „erwachsen“, 10 bis 14 Monate alte Mäuse als „mittelalt“ und 18 bis 24 Monate alte Tiere als „alt“ definiert (211, 267). Nach dieser Definition wurden in dieser Arbeit junge und mittelalte Mäuse verglichen. Vermutlich hätte sich ein Effekt des Alters bei der Verwendung von älteren Tieren deutlicher abgebildet.

In einigen der vorherigen Studien wurden teilweise ähnlich alte Tiere bzw. Versuchsgruppen mit ähnlichen Altersunterschieden verwendet (220, 247). In anderen wiederum werden als ältere Versuchsgruppe 18 bis 20 Monate alte Tiere verwendet (219, 220, 244, 267). Wiederum andere vergleichen mittelalte und alte Tiere (36). Aufgrund der unterschiedlichen Definition der Versuchsgruppen ist die Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien eingeschränkt (268).

Hinzukommt außerdem der Unterschied zwischen kalendarischem und biologischem oder physiologischem Alter. Trotz gleichem kalendarischen Alter, also vergangener Zeit seit der Geburt, kann das biologische Alter zwischen den Individuen sehr unterschiedlich ausfallen (268). Dadurch entsteht eine Heterogenität bezüglich unterschiedlicher Messwerte bei alten Versuchstieren (269, 270).

In der vorliegenden Arbeit wurden die tageszeitlichen Profile der betrachteten Gene auf Ebene der mRNA untersucht. Es sollte aber bedacht werden, dass die Rhythmen auf mRNA- und auf Proteinebene nicht immer übereinstimmen müssen (205). So wird die Korrelation von RNA- und Proteinmenge durch den RNA-Abbau und posttranskriptionelle Modifikationen beeinflusst (271-274). Darüber hinaus können auch diese Prozesse vom Alter der Mäuse abhängen. Diese Überlegungen zeigen, dass die Ergebnisse der vorliegenden mRNA-Mengen durch eine parallele Messung der Proteinmengen verifiziert und differenziert werden könnten.

5.2 ANOVA und Cosinoranalyse

Zur Untersuchung, ob sich die Genexpression über den Tagesverlauf verändert und ob diese rhythmisch ist, wurden zwei statistische Analysen verwendet. Mithilfe der einfaktoriellen ANOVA kann eine Aussage über statistisch auffällige Veränderungen der Genexpression im Tagesverlauf getroffen werden, jedoch nicht, ob die Expression eine Rhythmik aufweist (260). Um Aussagen bezüglich der Rhythmik der Genexpression zu treffen, kann die Cosinor-Analyse verwendet werden (260-264). Mithilfe dieser ist die Ermittlung einer Cosinusfunktion einschließlich der Charakteristika von Amplitude, Akrophase und Mesor anhand der Messwerte möglich (260, 261). In der Literatur ist sowohl die einfaktorielle ANOVA (89, 220, 275), als auch insbesondere die Cosinor-Analyse ein etabliertes Verfahren zur Analyse tageszeitlicher Unterschiede und rhythmischer Faktoren (136, 158, 276).

An dieser Stelle wäre eine Verbesserungsmöglichkeit für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Cosinor-Analyse zu nennen. Die Kalibrierung der verwendeten Cosinor-Formel verhindert nicht, dass das Minimum der kalibrierten Kurve unter Null fällt, wie es im Beispiel des Gens *Egr1* der Fall ist (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5). Da eine mRNA-Menge niemals negativ sein kann, sollte das Modell solche Werte nicht unterstellen.

5.3 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

Im Folgenden werden die in Kapitel 4 erläuterten Ergebnisse zur besseren Übersicht tabellarisch zusammengefasst. Die entsprechenden Tabellen und Abbildungen sind in Kapitel 4 (Abbildung 3 bis Abbildung 6 und Tabelle 7 bis Tabelle 10) sowie im Anhang (Abbildung 7 bis Abbildung 10) zu finden. Während die einfaktorielle ANOVA und die Cosinor-Analyse die Schwankung im Tagesverlauf und die Rhythmik der Genexpression untersuchen, analysiert der Mann-Whitney-U-Test den Einfluss des Alters auf die durchschnittliche Genexpression. Die Interaktion von Alter und Amplitude bzw. Phase wurde mittels eines Vergleiches von Cosinuskurven untersucht (siehe Kapitel 3 und Kapitel 4).

Gen	Tageszeitliche Veränderung				Interaktion von Alter und ...			Größenrelation	
	ANOVA p < 0,05		Cosinor p < 0,05		Durchschnittlicher Genexpression (Mann-Whitney-U- Test)	Amplitude und Phase (Cosinorvergleich)			
	70 Tage	365 Tage	70 Tage	365 Tage		p < 0,05	Amplitude p < 0,05	Phase p < 0,05	Durchschnittliche Genexpression
Molekularer Uhrmechanismus									
<i>Dec1</i>	✓	✓	✓		✓			70>365	
<i>Npas</i>					✓			70>365	
<i>Nr1d1</i>									
<i>Per1</i>	✓		✓						
<i>Per2</i>	✓		✓			✓			
<i>Per3</i>	✓	✓	✓						
<i>Rorβ</i>		✓			✓			70>365	
immediate early genes									
<i>c-Fos</i>	✓	✓		✓					
<i>Egr1</i>	✓	✓				✓			
<i>Nr4a1</i>	✓	✓		✓					
Sehprozess									
<i>Arr1</i>	✓	✓	✓	✓					
<i>Arr4</i>	✓	✓	✓	✓		✓			70>365
<i>Nr2e3</i>	✓	✓		✓					
<i>Rdh12</i>	✓	✓	✓	✓					
β-Oxidation von Fettsäuren									
<i>Acadm</i>	✓	✓	✓	✓			✓		
<i>Cpt1a</i>	✓	✓	✓	✓					
Dopaminwirkung									
<i>Drd4</i>	✓	✓	✓	✓					
<i>Gnaz</i>	✓	✓	✓	✓	✓			70>365	
Metabolismus- und Entgiftungsprozesse									
<i>Dbp</i>	✓	✓	✓	✓		✓			70>365
<i>E4bp4</i>		✓							

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der Befunde aus den Ergebnissen in Kapitel 4

Die entsprechenden Tabellen und Abbildungen sind in Kapitel 4 (Abbildung 4 bis Abbildung 7 und Tabelle 7 bis Tabelle 10) sowie im Anhang (Abbildung 8 bis Abbildung 11) zu finden. Die Einteilung der Gene in Gruppen erfolgte nach ihrer Hauptfunktion: die Gene des molekularen Uhrmechanismus sind gelb, immediate early genes dunkelgrün, in den Sehprozess involvierte Gene blau, an der β-Oxidation von Fettsäuren beteiligte Gene rot, an der Dopaminwirkung beteiligte Gene hellgrün und in Metabolismus- und Entgiftungsprozessen involvierte Gene orange hinterlegt.

5.4 Genexpression in den Retinae junger Mäuse

Bei 70 Tage alten Mäusen zeigten 60 % der Gene in der Retina sowohl in der einfaktoriellen ANOVA als auch in der Cosinor-Analyse eine statistisch auffällige Änderung bzw. Rhythmik der Genexpression im Tagesverlauf (siehe Abbildung 4 und Tabelle 7 sowie Abbildung 8 im Anhang). Zu diesen Genen gehören die Gene *Per1*, *Per2* und *Per3*, welche als Teil der ersten Rückkopplungsschleife des molekularen Uhrmechanismus fungieren (12, 19, 26). Dieses Ergebnis stimmt mit mehreren vorherigen Studien überein (13, 27, 89, 159, 160, 277-279) und unterstützt die Arbeitshypothese der Generierung eines zirkadianen Rhythmus in der Retina. In zwei früheren Arbeiten konnte allerdings für die Uhrengene *Per1* und *Per2* kein tageszeitlicher Rhythmus nachgewiesen werden (13, 278). Das als Teil einer zusätzlichen Schleife am molekularen Uhrmechanismus beteiligte Gen *Dec1* (62, 64) wies, ebenfalls in Übereinstimmung mit der Existenz einer retinalen zirkadianen Uhr, ebenso eine Rhythmik der tageszeitlichen Expression in der Retina auf. Sowohl die drei *Period*-Gene als auch *Dec1* haben ihr Expressionsmaximum in der Lichtphase (61, 200, 280, 281). Ob das Maximum von *Dec1*, dessen Protein die CLOCK-BMAL1-vermittelte Aktivierung des *Per1*-Promotors unterdrückt (61, 62), entsprechend seiner Funktion zeitversetzt zu dem Maximum von *Per1* erfolgt, lässt sich statistisch nicht belegen.

Dbp kodiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher an der Regulation von Genen für Entgiftungs- und Metabolismusprozesse beteiligt ist (112, 121). In der vorliegenden Arbeit zeigt *Dbp* ebenso eine statistisch auffällige Rhythmik der Expression wie in früheren Untersuchungen (19, 27, 89). Dies kann als Hinweis auf einen rhythmisch bzw. zirkadian organisierten Stoffwechsel der Retina gewertet werden (1, 19, 154).

Die weiteren Gene mit statistisch auffälliger tageszeitlicher Rhythmik und Maximum der Genexpression während der Lichtphase kodieren für Proteine mit Funktionen innerhalb der retinalen Physiologie, z. B. im Rahmen der Phototransduktion (*Arr1* und *Arr4*) (128, 129), des Sehprozesses (*Rdh12*) (137, 138, 140) und der β -Oxidation von Fettsäuren (*Acadm* und *Cpt1a*) (141-143). Passend zu der tageszeitlichen Rhythmik dieser Gene zeigen eine Vielzahl physiologischer Vorgänge in der Retina eine Rhythmik (1, 14, 19), u. a. die Verarbeitung optischer Signale zur Anpassung an die sich im Tagesverlauf ändernden Lichtbedingungen der Umgebung (12, 19, 186).

Die Lichtadaptation der Retina wird u. a. über Dopamin und den Dopamin-Rezeptor 4 vermittelt, für den das Gen *Drd4* kodiert (23, 133, 135). *Drd4* sowie *Gnaz*, dessen Proteinprodukt über Dopamin und den Dopamin-Rezeptor 4 die zirkadiane Uhr mit den G-Protein-vermittelten Signalwegen verbindet (136), zeigen ebenfalls eine statistisch auffällige tageszeitliche Rhythmik mit einem Maximum in der Dunkelperiode. Diese rhythmische Expression mit nächtlichem Maximum stimmt mit der Literatur überein (282, 283). Dopamin

fungiert als Signal für Licht (12, 42) und der Dopamin-Rezeptor 4 vermittelt die Lichtadaptation von Photorezeptoren über die Anpassung der Kontrastsensitivität und der Kopplung von Stäbchen und Zapfen (16, 17, 23, 135). Die zeitliche Verzögerung von maximaler Genexpression in der Dunkelphase und Hauptwirkung während der Lichtphase könnte der Zeitspanne entsprechen, die für die Translation der mRNA bzw. die Proteinbiosynthese benötigt wird.

Ein Fünftel der untersuchten Gene zeigt weder in der ANOVA noch in der Cosinor-Analyse eine Schwankung der Genexpression über den Tageszeitverlauf (siehe Abbildung 4 und Tabelle 7 sowie Abbildung 8 im Anhang). Diese Gene sind Transkriptionsfaktoren und im Falle von *Nr1d1*, das auch als *Rev-Erba* bezeichnet wird, und *Rorβ* sowie *Npas* als *Clock*-Homolog in den Rückkopplungsschleifen des molekularen Uhrmechanismus vertreten (19, 55, 56, 278). Vorherige Studien ergeben teils widersprüchliche Ergebnisse. So wurde für die Expression vom *Clock*-Homolog *Npas* einerseits übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen keine Rhythmik der Expression gefunden (13), während andere Autoren in spezifischen Zelltypen der Retina eine Rhythmik beobachteten (1). Ähnliches gilt für *Nr1d1*. Teilweise zeigte sich eine rhythmische Veränderung der Genexpression über den Tag (89, 155), während andere Studien keine Rhythmik feststellen konnten (279). Hierbei gilt zu beachten, dass sich im Falle der Studie von Dkhissi-Benyahya et al. eine Rhythmik der Expression in den Photorezeptoren, nicht aber in der inneren Retina feststellen ließ (89). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigt *Rorβ* in der Literatur eine Rhythmik der Expression (89, 279). Ob diese Differenz der Ergebnisse durch Unterschiede im Versuchsaufbau, z. B. aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Spezies, Untersuchung der Gesamtretina oder einzelner retinaler Zelltypen, oder durch Messfehler zustande kommt, muss momentan offen bleiben.

Ein Fünftel der Gene zeigte nur in der ANOVA nicht aber in der Cosinor-Analyse eine statistisch relevante Veränderung der tageszeitlichen Expression, nämlich die Gene *c-Fos*, *Egr1*, *Nr2e3* und *Nr4a1* (siehe Abbildung 4 und Tabelle 7 sowie Abbildung 8 im Anhang). Für die immediate early Gene *c-Fos*, *Egr1* und *Nr4a1* ist dies in Übereinstimmung mit der Literatur, da in früheren Studien ebenfalls mittels einfaktorieller ANOVA eine tageszeitliche Veränderung der Genexpression gefunden wurde (117, 276, 277, 284-287). Die Expression der immediate early Gene wird durch Reize, wie z. B. Licht induziert (97-99, 103) und als Transkriptionsfaktoren vermitteln die Produkte dieser Gene gemeinsam mit anderen Faktoren die Anpassung der Uhr auf Lichtreize (97, 104-106). Die Höhe der Genexpression der immediate early Gene als Reaktion auf einen Lichtreiz ist abhängig von der Tageszeit (98, 99, 104, 288), sodass die tageszeitliche Expression der Gene entsprechend schwankt. Die Veränderung der Expression der Gene *c-Fos*, *Egr1* und *Nr4a1* über den Tagesverlauf ist für die tageszeitliche Adaptation der Retina von Relevanz. So vermittelt die tageszeitliche

Veränderung der *Egr1*-Expression (284, 286) die rhythmische Erneuerung der Außensegmente der Stäbchen (20, 144, 145). Die Gene *c-Fos* und *Nr4a1* beeinflussen die Reaktion der Retina auf schädliche Reize wie Stress oder Licht (99, 146-150). Entsprechend könnte die tageszeitliche Schwankung der Genexpression von *c-Fos* und *Nr4a1* bedingen, dass die Retina in der Dunkelheit anfälliger gegenüber photischen Reizen ist (146, 289).

In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (124, 276) wurde auch für das Gen *Nr2e3* eine Veränderung der tageszeitlichen Expression gefunden. Da *Nr2e3* an der Regulation der Expression von photorezeptorspezifischen Genen und Photopigmenten und damit der Phototransduktion beteiligt ist, könnte dies für die tageszeitliche Adaptation und damit den Erhalt der Photorezeptoren relevant sein (118, 123-125).

5.5 Auswirkungen des Alters auf Genexpression und tageszeitliche Rhythmen

Im zirkadianen System kommt es mit dem Alter zu zahlreichen Veränderungen der Rhythmen, z. B. zu einer Abnahme der allgemeinen Aktivität mit Veränderung des Aktivitätsrhythmus (29, 33, 34). In der sog. Meisteruhr des zirkadianen Systems im NSC werden mit dem Alter u. a. verminderte Output-Signale sowie eine Abnahme der Amplitude des elektrischen Aktivitätsrhythmus beobachtet (211, 215, 216). Da die Retina ein organeigenes zirkadianes System beinhaltet, stellt sich die Frage, ob auch in diesem Gewebe altersbedingte Veränderungen der zirkadianen Uhr auftreten.

In der vorliegenden Arbeit zeigen sich in der Versuchsgruppe der alten Tiere (365 Tage) im Vergleich zu der Gruppe junger Tiere (70 Tage) einige Unterschiede bezüglich der durchschnittlichen Genexpression und der Amplitude und Phase der tageszeitlichen Rhythmen. So zeigt ein Fünftel der untersuchten Gene einen statistischen Einfluss des Alters auf die durchschnittliche Genexpression und ein Fünftel der Gene einen statistisch auffälligen Einfluss auf die Amplitude der Expressionsrhythmen. Vergleiche mit vorherigen Studien lassen sich nur schwer führen, da es nur wenige Daten zur retinalen Genexpression im Alter gibt. Außerdem ist der Vergleich zwischen unterschiedlichen Arbeiten erschwert, da andere Spezies oder andere Mausstämme als Versuchstiere verwendet werden, ebenso sind oft andere retinale Zelltypen oder Schichten Grundlage der Untersuchungen (1, 19, 89, 108, 159, 161). Zur Klärung der Frage, ob die zirkadianen Uhren verschiedener Gewebe vom Alter in gleicher oder unterschiedlicher Weise betroffen sind, wird im Folgenden insbesondere der Effekt des Alters auf die tageszeitliche Genexpression zwischen Retina und NSC verglichen.

5.5.1 Auswirkungen des Alters auf Gene des molekularen Uhrmechanismus

In der Retina zeigen die zentralen Uhrengene, zu denen *Per1*, *Per2* und *Per3* sowie *Nr1d1* und *Rorβ* gehören und die die beiden grundlegenden Rückkopplungsschleifen des molekularen Uhrmechanismus bilden (12, 19, 26, 55, 56), zum Teil einen Effekt des Alters auf die Rhythmik. Die *Period*-Gene *Per1*, *Per2* und *Per3* zeigen im jungen Alter eine statistisch auffällige Rhythmik, welche im höheren Alter nicht mehr vorhanden ist (siehe Abbildung 5 und Tabelle 8 sowie Abbildung 9 im Anhang). Anders als in der vorliegenden Arbeit, wurde in der Retina auch im Alter eine Rhythmik der *Per2*-Expression gezeigt, bei jedoch verminderter Amplitude (247). Im SCN zeigten die zentralen Uhrengene *Per1* und *Per2* in verschiedenen Arbeiten ebenfalls eine tageszeitliche Rhythmik der Genexpression bei jungen und alten Versuchstieren, teilweise jedoch ähnlich wie in der Retina mit reduzierter Amplitude des Rhythmus (34, 36, 218-220). Hieraus lässt sich also ableiten, dass Retina und NSC im Alter übereinstimmend eine reduzierte Rhythmik in der Expression zentraler Uhrengene zeigen.

Als Teil einer zusätzlichen Schleife im molekularen Uhrenmechanismus hemmt *Dec1* die CLOCK-BMAL1-vermittelte Aktivierung des *Per1*-Promotors (61, 62, 64). Im Gegensatz zur jungen Versuchsgruppe zeigt *Dec1* im Alter keine statistisch auffällige Rhythmik im Tagesverlauf. Diese mit dem Alter abnehmende tageszeitliche Rhythmik der *Dec1*-Expression kann als weiterer Hinweis auf eine Beeinträchtigung der zirkadianen retinalen Uhr im Alter interpretiert werden (siehe Abbildung 5 und Tabelle 8 sowie Abbildung 9 im Anhang). Diese Interpretation wird durch Befunde unterstützt, dass die Rhythmik der Uhrengene *Clock* und *Bmal1* im SCN durch das Alter beeinträchtigt wird, wobei die Ergebnisse zwischen den Studien teilweise widersprüchlich sind (220).

Die Kernuhrengene *Nr1d1* und *Rorβ* weisen sowohl bei jungen als auch alten Mäusen keine statistisch auffällige Rhythmik der Genexpression über den Tagesverlauf auf (siehe Abbildung 5 und Tabelle 8 sowie Abbildung 9 im Anhang). Auch das *Clock*-Homolog *Npas* (66-68) zeigt in keiner Altersgruppe eine statistisch signifikante tageszeitliche Rhythmik (siehe Abbildung 5 und Tabelle 8 sowie Abbildung 9 im Anhang). Aufgrund der fehlenden Rhythmik in der jungen Altersgruppe erlauben unsere Untersuchungen keine Aussage über einen Effekt des Alters auf das tageszeitliche Expressionsprofil.

Die Untersuchung der durchschnittlichen Genexpression, der Amplitude und der Phase des Expressionsrhythmus zeigte für die zentralen Uhrengene keinen statistisch relevanten Einfluss des Alters. Dies steht nicht im Einklang mit bisherigen Studien, in denen für einige zentrale Uhrengene Veränderungen der Phase mit dem Alter beobachtet wurden. So wurde z. B. ein Vorschub der Phase des Expressionsprofils von *Per2* in der Retina alter Tiere (247) und ein Phasenvorschub der Expression von *Per1* in peripheren Geweben (219) gefunden. Einen Effekt des Alters auf die durchschnittliche Genexpression zeigen nur die Gene *Dec1*, *Npas* und *Rorβ*, wobei für alle drei Gene der Median der durchschnittlichen Genexpression bei 70 Tagen höher als bei 365 Tagen lag (siehe Abbildung 6, Abbildung 7, Tabelle 9 und Tabelle 10 sowie Abbildung 10 und Abbildung 11 im Anhang). Die Gene *Per1*, *Per2*, *Per3* und *Nr1d1* weisen keinen statistisch auffälligen Einfluss auf die durchschnittliche Genexpression auf. Ein Großteil der zentralen Uhrengene zeigt also eine mit dem Alter beständige Höhe der durchschnittlichen Genexpression im Tagesverlauf. Dies zeigt, dass der Verlust der tageszeitlichen Rhythmik dieser Gene nicht auf eine kontinuierlich verminderte Transkription dieser Gene zurückzuführen ist.

Einen Einfluss des Alters auf die Amplitude zeigt nur das Gen *Per2*. Dieser Befund ist im Einklang mit früheren Studien (36, 247). Die Phase zeigt bei keinem anderen der untersuchten Gene einen statistisch auffälligen Einfluss des Alters, sodass davon ausgegangen werden kann, dass für diese anderen Gene trotz abgeschwächter Rhythmik der Expression im Alter die Zeitpunkte maximaler und minimaler Expression gleichbleiben. Dies bedeutet, dass die

tageszeitliche Rhythmik durch das Alter zwar abgeschwächt, aber nicht phasenverschoben wird.

Zusammenfassend zeigt sich ein Einfluss des Alters auf die am molekularen Uhrmechanismus beteiligten Gene. Insbesondere die Rhythmik der Genexpression im Tagesverlauf scheint mit dem Alter schwächer zu werden, während die Charakteristika der Rhythmen wie Amplitude und Phase tendenziell bestehen bleiben.

5.5.2 Auswirkungen des Alters auf immediate early genes

Die immediate early Gene *c-Fos*, *Egr1* und *Nr4a1* sind Transkriptionsfaktoren für unterschiedliche physiologische Prozesse (104, 116) und vermitteln das Entrainment des zirkadianen Systems (106, 107). Ihre Expression wird durch gewisse Reize, wie z. B. Licht, induziert (98, 99). Betrachtet man die tageszeitliche Schwankung der Expression dieser Gene, so fällt auf, dass die beiden immediate early Gene *c-Fos* und *Nr4a1* in der ANOVA sowohl bei jungen als auch alten Mäusen eine statistisch auffällige Schwankung der tageszeitlichen Genexpression zeigen, während die Cosinoranalyse nur für alte Mäuse einen statistisch auffälligen Rhythmus zeigt. Das Gen *Egr1* zeigt für beide Altersgruppen eine tageszeitliche Schwankung der Genexpression in der ANOVA, jedoch nicht in der Cosinoranalyse. Veränderungen der Genexpression der immediate early Gene mit dem Alter wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der angewendeten Verfahren, kann nicht abschließend beurteilt werden, ob die Rhythmik der IEGs vom Alter beeinflusst wird, eine Abnahme der Rhythmik im Alter erscheint aber unwahrscheinlich.

Eine statistisch auffällige Veränderung der durchschnittlichen Genexpression mit dem Alter zeigen die immediate early Gene *c-Fos*, *Egr1* und *Nr4a1* nicht. Dies kann als Hinweis auf die weiterhin bestehende und mit dem Alter unveränderte Lichtinduzierbarkeit der IEG interpretiert werden.

Auch auf die Amplitude zeigt das Alter nur bei *Egr1* einen statistisch auffälligen Einfluss, während für die *c-Fos* und *Nr4a1* keine statistische Auffälligkeit zu beobachten war. *Egr1* zeigt dabei im tageszeitlichen Expressionsprofil eine höhere Amplitude im Alter von 365 Tagen als mit 70 Tagen, sodass die maximale Genexpression bei älteren Mäusen größer als bei jüngeren Tieren ist. Die im Alter erhöhte Amplitude der *Egr1*-Expression kontrastiert mit früheren Befunden, die eine erhöhte Schwelle für die Induktion der immediate early Gene im Alter beobachteten (30, 238, 239, 243).

5.5.3 Auswirkungen des Alters auf in den Sehprozess involvierte Gene

Als Hinweis auf eine in den Grundzügen im Alter unveränderte tageszeitliche Rhythmik der visuellen Verarbeitung kann der Befund gewertet werden, dass die Gene *Arr1*, *Arr4*, *Nr2e3* und *Rdh12* eine statistisch auffällige Rhythmik mit einem zu ihrer Funktion „passenden“ Maximum während der Lichtphase zeigen (siehe Abbildung 5 und Tabelle 8 sowie Abbildung 9 im Anhang). Ebenso wie die Rhythmik zeigt sich für diese Gene auch die durchschnittliche Genexpression ohne statistisch auffälligen Einfluss durch das Alter (siehe Abbildung 6 und Tabelle 9 sowie Abbildung 10).

Als weiterer Anhaltspunkt für eine im Alter konsistente Rhythmik der Expression „visueller Gene“ ist der ebenfalls fehlende Einfluss des Alters auf Amplitude und Phase der Expressionsrhythmen zu nennen. Lediglich *Arr4* zeigt einen statistisch auffälligen Einfluss auf die Amplitude mit höherer Amplitude bei den 70 Tage alten Tieren (siehe Abbildung 7 und Tabelle 10 sowie Abbildung 11 im Anhang).

In der Literatur werden jedoch altersbedingte Veränderungen des Sehprozesses und Einschränkungen der optischen Signalverarbeitung auf funktioneller Ebene, sichtbar durch Veränderungen im Elektroretinogramm, beschrieben (248, 249, 251, 252). Daher wäre in der vorliegenden Arbeit ein größerer Einfluss des Alters auf die beteiligten Gene zu erwarten gewesen. Ein Grund für die Diskrepanz könnte sein, dass andere in die visuelle Verarbeitung involvierte Gene für die altersbedingten Beeinträchtigungen der optischen Signalverarbeitung verantwortlich sind.

5.5.4 Auswirkungen des Alters auf Gene des dopaminergen Systems

Dopamin gilt als Signal für Licht und steuert u. a. über den Dopamin D4-Rezeptor, für den das Gen *Drd4* kodiert, die Lichtadaptation der Photorezeptoren durch Beeinflussung der Kontrastsensitivität und der Kopplung von Stäbchen und Zapfen (16, 17, 23, 135). Das uhrenkontrollierte Gen *Gnaz* verbindet über Dopamin und D4-Rezeptoren die zirkadiane Uhr mit G-Protein-vermittelten Signalwegen (136). Frühere Studien haben eine Abhängigkeit retinaler Funktionen, u. a. der optischen Verarbeitung, vom Alter gezeigt (247), sodass auch ein Einfluss des Alters auf die an der Lichtadaptation beteiligten Gene *Drd4* und *Gnaz* möglich erschien.

Die beiden Gene *Drd4* und *Gnaz* zeigen bei den jungen und alten Versuchstieren eine statistisch auffällige Rhythmik mit zur Funktion „passendem“ Maximum während der Dunkelphase (siehe Abbildung 4, Abbildung 5, Tabelle 7 und Tabelle 8 sowie Abbildung 8 und Abbildung 9 im Anhang). Dies suggeriert eine Konsistenz der Lichtadaptation im Alter. Die durchschnittliche Genexpression weist einen statistisch signifikanten Einfluss des Alters für

das Gen *Gnaz* auf, jedoch sind Amplitude und Phase vom Alter unabhängig. *Drd4* zeigt keinen statistisch auffälligen Einfluss des Alters auf die durchschnittliche Genexpression, Amplitude oder Phase des Rhythmus, wobei die durchschnittliche Genexpression und die Amplitude des Rhythmus bei jüngeren Mäusen größer sind als bei alten (siehe Abbildung 6, Abbildung 7, Tabelle 9 und Tabelle 10 sowie Abbildung 10 und Abbildung 10 im Anhang). Aufgrund der im Alter weiterhin bestehenden tageszeitlichen Rhythmik sowie des fehlenden Einflusses des Alters auf die Merkmale dieses Rhythmus und die durchschnittliche Genexpression, ist zu erwarten, dass die Lichtadaptation im Alter unverändert ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird in der Literatur bei alten Versuchstieren eine verminderte Lichtadaptation mit reduzierter Sensibilität und Responsivität gegenüber Licht sowie einer erhöhten Schwelle für Licht und durch Licht induzierte phasenverschiebende Effekte beschrieben (238, 239, 290). Es wurde außerdem in bisherigen Studien eine erhöhte Sensibilität der Retinae mit dem Alter gegenüber Dopamin beobachtet (291) bei erhöhter Dopaminrezeptordichte mit verringerter Abbaurate dieser Rezeptoren in Retinae alter Versuchstiere (291-293). Folglich zeigen unsere Befunde, dass diese altersabhängigen Veränderungen nicht auf eine modifizierte Expression der Gene *Drd4* oder *Gnaz* beruhen.

5.5.5 Auswirkungen des Alters auf an der β -Oxidation beteiligte Gene

Uhrenkontrolliert sind ebenfalls die an der Verstoffwechslung von Fettsäuren beteiligten Gene *Acadm* und *Cpt1a* (141, 142). Als Hinweis auf eine im Alter unveränderte enzymatische Grundlage der β -Oxidation von Fettsäuren zeigen die Gene *Acadm* und *Cpt1a* auch bei den alten Mäusen eine statistisch auffällige tageszeitliche Rhythmik mit einem Maximum der Expression während der Lichtphase (siehe Abbildung 5 und Tabelle 8 sowie Abbildung 9 im Anhang).

Als weiterer Hinweis auf die Konsistenz der Fettsäureverstoffwechslung mit dem Alter zeigen sowohl *Acadm* als auch *Cpt1a* keinen statistisch auffälligen Einfluss des Alters auf die durchschnittliche Genexpression oder die Amplitude des Expressionsrhythmus (siehe Abbildung 6, Abbildung 7, Tabelle 9 und Tabelle 10 sowie Abbildung 10 und Abbildung 11 im Anhang). Als einziges der 20 untersuchten Gene zeigt *Acadm* allerdings einen statistisch auffälligen Einfluss des Alters auf die Phase des Rhythmus (siehe Abbildung 6, Abbildung 7, Tabelle 9 und Tabelle 10 sowie Abbildung 10 und Abbildung 11 im Anhang). Das Minimum und Maximum der *Acadm*-Expression finden hierbei bei 365 Tage alten Tieren früher als bei 70 Tage alten Tieren statt. Dies könnte bedeuten, dass die Oxidation von Fettsäuren im Alter phasenverschoben erfolgt. Ebenso wie *Acadm* zeigen auch andere Gene eine altersbedingte Phasenverschiebung (247).

5.5.6 Auswirkungen des Alters auf Gene des Metabolismus und der Entgiftung

Für die retinale Physiologie ebenfalls von Bedeutung ist der Metabolismus und die Entgiftung. Der hieran beteiligte Transkriptionsfaktor *Dbp* ist direkt kontrolliert durch CLOCK und damit durch die zirkadiane Uhr und aktiviert über eine D-Box in den Promotoren die Expression von an Entgiftungs- und Stoffwechselprozessen beteiligten Genen (110, 112, 113). Durch kompetitive Bindung eines weiteren Transkriptionsfaktors, für den das Gen *E4bp4* kodiert, wird diese Aktivierung unterdrückt (113, 114).

Genau wie in der jungen Versuchsgruppe zeigt *Dbp* auch in der alten Versuchsgruppe eine statistisch signifikante tageszeitliche Rhythmik mit einem Maximum während der Lichtphase. *E4bp4* zeigt weder bei jungen noch bei alten Versuchstieren eine statistisch auffällige tageszeitliche Rhythmik der Expression (siehe Abbildung 4, Abbildung 5, Tabelle 7 und Tabelle 8 sowie Abbildung 8 und Abbildung 9 im Anhang). Dies divergiert mit früheren Befunden, die eine Rhythmik für *E4bp4* beobachten (89).

Während die vorliegenden Befunde einen statistisch auffälligen Einfluss des Alters auf die Amplitude der Expression von *Dbp* mit kleinerer Amplitude bei 365 Tage alten Tieren aufwiesen, zeigt sich kein statistisch auffälliger Einfluss auf die durchschnittliche Genexpression oder Phase des Rhythmus. Für *E4bp4* zeigt sich weder für die durchschnittliche Genexpression noch für Amplitude oder Phase ein auffälliger Alterseinfluss (siehe Abbildung 6, Abbildung 7, Tabelle 9 und Tabelle 10 sowie Abbildung 10 und Abbildung 11 im Anhang). Die kleinere Amplitude von *Dbp* bei alten Tieren kann möglicherweise auf eine Verminderung von Entgiftung und Metabolismus im Alter hindeuten. Hierbei muss aber eingeschränkt werden, dass die beiden untersuchten Gene nur einen Bruchteil der an Entgiftung und Metabolismus beteiligten Gene darstellen. Allerdings regulieren diese als uhrenkontrollierte Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl stoffwechselrelevanter Gene (112-115, 121, 122).

5.5.7 Auswirkungen des Alters auf die Phase tageszeitlicher Rhythmen

Erwähnenswert ist außerdem, dass nur eines der 20 untersuchten Gene einen statistisch auffälligen Einfluss des Alters auf die Phase der Expressionsrhythmen zeigt (siehe Tabelle 10). Dies bedeutet, dass es mit dem Alter bei dem Großteil der Gene zu keiner Verschiebung der Expressionskurve führt und Minimum sowie Maximum der Expression in den beiden Versuchsgruppen zum selben Zeitpunkt für jedes Gen erfolgen. In vorherigen Studien wurden bisher meist Veränderungen der Phase mit dem Alter beschrieben, so z. B. ein Phasenvorschub des Expressionsprofils von *Per2* in der Retina alter Tiere (247) oder ebenfalls ein Phasenvorschub der *Per1*-Expression in peripheren Geweben (219).

6 Zusammenfassung

Zirkadiane Uhren, welche in vielen Geweben und Organen eines Organismus vorkommen, bestehen aus transkriptionellen Rückkopplungsschleifen zwischen Uhrengenen und bereiten den Körper auf tageszeitliche Wechsel in der Umgebung vor. Die sog. „Meisteruhr“ im Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus nimmt eine Sonderstellung ein, da sie untergeordnete Uhren in verschiedenen peripheren Geweben kontrolliert. Die Retina hingegen besitzt eine eigene zirkadiane Uhr, welche vermutlich unabhängig von der „Meisteruhr“ im Nucleus suprachiasmaticus fungiert. Diese retinale Uhr antizipiert die Anpassung an die sich im Tagesverlauf verändernden Lichtbedingungen. Die Uhr des NSC unterliegt altersabhängigen Veränderungen, wobei z. B. die Amplitude der uhrenabhängigen Rhythmik reduziert ist (29, 34-37).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Alters auf die tageszeitlichen Profile von zwanzig retinalen Genen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die tageszeitlichen Profile der Genexpression bei 70 und 365 Tage alten Mäusen mittels quantitativer PCR vergleichend analysiert. Hierbei wurde auf Gene fokussiert, die in früheren Studien eine tageszeitliche Rhythmik ihrer Expression zeigten und für die zirkadiane Uhr und/oder die Physiologie der Retina relevant sind.

Vierzehn der untersuchten Gene zeigten sowohl bei jungen als auch bei alten Mäusen eine statistisch auffällige Rhythmik der Genexpression über den Tagesverlauf. Sechs Gene zeigten dagegen eine altersabhängige Veränderung des tageszeitlichen Profils. So wiesen die Gene *Per1*, *Per2*, *Per3* und *Dec1* eine statistisch auffällige Rhythmik nur bei jungen, nicht jedoch bei alten Mäusen auf. Diese vier Gene sind allesamt elementare Bestandteile des molekularen Mechanismus der zirkadianen Uhr. Insofern suggerieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine altersabhängige Beeinträchtigung der molekularen Grundlage der zirkadianen Uhr der Retina. Zwei weitere Gene, die sog. immediate early Gene *c-Fos* und *Nr4a1*, zeigten nur im Alter eine auffällige Rhythmik der Genexpression. Dies könnte auf eine im Alter erhöhte Lichtinduzierbarkeit dieser Gene zurückzuführen sein.

Die Höhe der durchschnittlichen Genexpression wird bei vier der zwanzig untersuchten Gene durch das Alter verringert. So wiesen die Uhrengene *Dec1*, *Npas* und *Rorβ* eine verminderte durchschnittliche Genexpression auf. Dieser Befund lässt vermuten, dass eine verminderte Expression von Uhrengenen die Funktion der retinalen Uhr abschwächt.

Die Charakteristika der tageszeitlichen Expressionsprofile, nämlich Amplitude und Phase, zeigten sich bei den meisten Genen mit dem Alter unverändert. Ein Einfluss des Alters auf die Amplitude fällt bei vier Genen (*Arr4*, *Dbp*, *Egr1* und *Per2*) auf, die Phase wird lediglich bei dem Gen *Acadm* durch das Alter beeinflusst. Insgesamt lässt dies vermuten, dass das tageszeitliche „Timing“ der retinalen Genexpression vom Alter nur wenig beeinflusst wird.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass die molekularen Mechanismen der Uhr im Alter abgeschwächt sind und dies für die bekannten Veränderungen der retinalen Physiologie im Alter mitverantwortlich sein könnte.

7 Literaturverzeichnis

1. McMahon DG, Iuvone PM, Tosini G. Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2014;39:58-76.
2. Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1960;25:11-28.
3. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002;418(6901):935-41.
4. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science.* 2000;288(5466):682-5.
5. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science.* 1990;247(4945):975-8.
6. Aschoff J. CIRCADIEN RHYTHMEN IN MAN. *Science.* 1965;148(3676):1427-32.
7. Foster RG, Hughes S, Peirson SN. Circadian Photoentrainment in Mice and Humans. *Biology (Basel).* 2020;9(7).
8. Paul KN, Saafir TB, Tosini G. The role of retinal photoreceptors in the regulation of circadian rhythms. *Rev Endocr Metab Disord.* 2009;10(4):271-8.
9. Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev.* 2010;90(3):1063-102.
10. Yamazaki S, Goto M, Menaker M. No evidence for extraocular photoreceptors in the circadian system of the Syrian hamster. *J Biol Rhythms.* 1999;14(3):197-201.
11. Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science.* 1996;272(5260):419-21.
12. Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM. The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays.* 2008;30(7):624-33.
13. Liu X, Zhang Z, Ribelayga CP. Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina. *PLoS One.* 2012;7(11):e50602.
14. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res.* 2005;24(4):433-56.
15. Tosini G, Fukuhara C. The mammalian retina as a clock. *Cell Tissue Res.* 2002;309(1):119-26.
16. Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron.* 2008;59(5):790-801.
17. Ribelayga C, Wang Y, Mangel SC. Dopamine mediates circadian clock regulation of rod and cone input to fish retinal horizontal cells. *J Physiol.* 2002;544(3):801-16.
18. Ribelayga C, Wang Y, Mangel SC. A circadian clock in the fish retina regulates dopamine release via activation of melatonin receptors. *J Physiol.* 2004;554(Pt 2):467-82.
19. Felder-Schmittbuhl MP, Buhr ED, Dkhissi-Benyahya O, Hicks D, Peirson SN, Ribelayga CP, et al. Ocular Clocks: Adapting Mechanisms for Eye Functions and Health. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59(12):4856-70.
20. LaVail MM. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science.* 1976;194(4269):1071-4.
21. Young RW. The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978;17(2):105-16.
22. Pierce ME, Sheshberadaran H, Zhang Z, Fox LE, Applebury ML, Takahashi JS. Circadian regulation of iodopsin gene expression in embryonic photoreceptors in retinal cell culture. *Neuron.* 1993;10(4):579-84.
23. Jackson CR, Ruan GX, Aseem F, Abey J, Gamble K, Stanwood G, et al. Retinal dopamine mediates multiple dimensions of light-adapted vision. *J Neurosci.* 2012;32(27):9359-68.
24. Tosini G, Baba K, Hwang CK, Iuvone PM. Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Exp Eye Res.* 2012;103:82-9.
25. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health.* 2001;25(2):85-93.

26. Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet.* 2008;9(10):764-75.
27. Sakamoto K, Oishi K, Shiraishi M, Hamano S, Otsuka H, Miyake Y, et al. Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. *Neuroreport.* 2000;11(18):3995-7.
28. Sakamoto K, Ishida N. Circadian expression of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett.* 1998;245(2):113-6.
29. Banks G, Nolan PM, Peirson SN. Reciprocal interactions between circadian clocks and aging. *Mamm Genome.* 2016;27(7-8):332-40.
30. Lupi D, Semo M, Foster RG. Impact of age and retinal degeneration on the light input to circadian brain structures. *Neurobiol Aging.* 2012;33(2):383-92.
31. Peng MT, Jiang MJ, Hsü HK. Changes in running-wheel activity, eating and drinking and their day/night distributions throughout the life span of the rat. *J Gerontol.* 1980;35(3):339-47.
32. Possidente B, McEldowney S, Pabon A. Aging lengthens circadian period for wheel-running activity in C57BL mice. *Physiol Behav.* 1995;57(3):575-9.
33. Valentinuzzi VS, Scarbrough K, Takahashi JS, Turek FW. Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. *Am J Physiol.* 1997;273(6):R1957-64.
34. Kolker DE, Fukuyama H, Huang DS, Takahashi JS, Horton TH, Turek FW. Aging alters circadian and light-induced expression of clock genes in golden hamsters. *J Biol Rhythms.* 2003;18(2):159-69.
35. Cornelissen G, Otsuka K. Chronobiology of Aging: A Mini-Review. *Gerontology.* 2017;63(2):118-28.
36. Nakamura TJ, Nakamura W, Yamazaki S, Kudo T, Cutler T, Colwell CS, et al. Age-related decline in circadian output. *J Neurosci.* 2011;31(28):10201-5.
37. Farajnia S, Michel S, Deboer T, vanderLeest HT, Houben T, Rohling JH, et al. Evidence for neuronal desynchrony in the aged suprachiasmatic nucleus clock. *J Neurosci.* 2012;32(17):5891-9.
38. Sandu C, Hicks D, Felder-Schmittbuhl MP. Rat photoreceptor circadian oscillator strongly relies on lighting conditions. *Eur J Neurosci.* 2011;34(3):507-16.
39. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972;42(1):201-6.
40. Herzog ED. Neurons and networks in daily rhythms. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(10):790-802.
41. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:517-49.
42. Green CB, Besharse JC. Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *J Biol Rhythms.* 2004;19(2):91-102.
43. Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature.* 1996;382(6594):810-3.
44. Takahashi JS. Finding new clock components: past and future. *J Biol Rhythms.* 2004;19(5):339-47.
45. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell.* 1999;96(2):271-90.
46. Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell.* 2000;103(7):1009-17.
47. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science.* 1998;280(5369):1564-9.
48. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, et al. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell.* 1999;98(2):193-205.
49. Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, et al. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science.* 1998;280(5369):1599-603.

50. Hida A, Koike N, Hirose M, Hattori M, Sakaki Y, Tei H. The human and mouse *Period1* genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of *mPer1* transcription. *Genomics*. 2000;65(3):224-33.
51. Munoz E, Baler R. The circadian E-box: when perfect is not good enough. *Chronobiol Int*. 2003;20(3):371-88.
52. Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S, Bradfield CA. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(10):5474-9.
53. Sato TK, Yamada RG, Ukai H, Baggs JE, Miraglia LJ, Kobayashi TJ, et al. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nat Genet*. 2006;38(3):312-9.
54. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*. 2001;107(7):855-67.
55. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 2002;110(2):251-60.
56. Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*. 2005;20(5):391-403.
57. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, et al. A functional genomics strategy reveals *Rora* as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 2004;43(4):527-37.
58. Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, et al. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*. 2002;418(6897):534-9.
59. Harding HP, Lazar MA. The orphan receptor Rev-ErbA α activates transcription via a novel response element. *Mol Cell Biol*. 1993;13(5):3113-21.
60. Nakajima Y, Ikeda M, Kimura T, Honma S, Ohmiya Y, Honma K. Bidirectional role of orphan nuclear receptor ROR α in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system. *FEBS Lett*. 2004;565(1-3):122-6.
61. Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, et al. *Dec1* and *Dec2* are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*. 2002;419(6909):841-4.
62. Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, et al. A novel autofeedback loop of *Dec1* transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(1):117-24.
63. Sato F, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Honda KK, Honma S, et al. Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor *DEC1* in circadian regulation. Interaction with *BMAL1*. *Eur J Biochem*. 2004;271(22):4409-19.
64. Bode B, Shahmoradi A, Taneja R, Rossner MJ, Oster H. Genetic interaction of *Per1* and *Dec1/2* in the regulation of circadian locomotor activity. *J Biol Rhythms*. 2011;26(6):530-40.
65. Zhou YD, Barnard M, Tian H, Li X, Ring HZ, Francke U, et al. Molecular characterization of two mammalian bHLH-PAS domain proteins selectively expressed in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(2):713-8.
66. DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. *CLOCK* and *NPAS2* have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci*. 2007;10(5):543-5.
67. Landgraf D, Wang LL, Diemer T, Welsh DK. *NPAS2* Compensates for Loss of *CLOCK* in Peripheral Circadian Oscillators. *PLoS Genet*. 2016;12(2):e1005882.
68. Bertolucci C, Cavallari N, Colognesi I, Aguzzi J, Chen Z, Caruso P, et al. Evidence for an overlapping role of *CLOCK* and *NPAS2* transcription factors in liver circadian oscillators. *Mol Cell Biol*. 2008;28(9):3070-5.
69. Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:407-41.
70. Saini C, Suter DM, Liani A, Gos P, Schibler U. The mammalian circadian timing system: synchronization of peripheral clocks. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:39-47.
71. Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*. 2013(217):3-27.

72. Korf HW, von Gall C. Mice, melatonin and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;252(1-2):57-68.
73. Fu Y, Zhong H, Wang MH, Luo DG, Liao HW, Maeda H, et al. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(29):10339-44.
74. Rollag MD, Berson DM, Provencio I. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms.* 2003;18(3):227-34.
75. Hannibal J, Georg B, Hindersson P, Fahrenkrug J. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci.* 2005;27(2):147-55.
76. Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* 2002;295(5557):1065-70.
77. Hannibal J, Hindersson P, Knudsen SM, Georg B, Fahrenkrug J. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci.* 2002;22(1):Rc191.
78. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science.* 2002;295(5557):1070-3.
79. Aranda ML, Schmidt TM. Diversity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: circuits and functions. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(3):889-907.
80. Zhang DQ, Belenky MA, Sollars PJ, Pickard GE, McMahan DG. Melanopsin mediates retrograde visual signaling in the retina. *PLoS One.* 2012;7(8):e42647.
81. Warren EJ, Allen CN, Brown RL, Robinson DW. Intrinsic light responses of retinal ganglion cells projecting to the circadian system. *Eur J Neurosci.* 2003;17(9):1727-35.
82. Moore RY, Speh JC, Card JP. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol.* 1995;352(3):351-66.
83. Meijer JH, Schwartz WJ. In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms.* 2003;18(3):235-49.
84. Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau KW, et al. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol.* 2006;497(3):326-49.
85. Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature.* 2003;424(6944):76-81.
86. Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, et al. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science.* 2003;301(5632):525-7.
87. Buhr ED, Van Gelder RN. Local photic entrainment of the retinal circadian oscillator in the absence of rods, cones, and melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(23):8625-30.
88. Güler AD, Ecker JL, Lall GS, Haq S, Altimus CM, Liao HW, et al. Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature.* 2008;453(7191):102-5.
89. Dkhissi-Benyahya O, Coutanson C, Knoblauch K, Lahouaoui H, Leviel V, Rey C, et al. The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(18):3435-47.
90. Buhr ED, Yue WW, Ren X, Jiang Z, Liao HW, Mei X, et al. Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(42):13093-8.
91. Yamashita T, Ohuchi H, Tomonari S, Ikeda K, Sakai K, Shichida Y. Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(51):22084-9.
92. Kojima D, Mori S, Torii M, Wada A, Morishita R, Fukada Y. UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS One.* 2011;6(10):e26388.
93. D'Souza SP, Swygart DI, Wienbar SR, Upton BA, Zhang KX, Mackin RD, et al. Retinal patterns and the cellular repertoire of neuropsin (Opn5) retinal ganglion cells. *J Comp Neurol.* 2021.

94. Tarttelin EE, Bellingham J, Hankins MW, Foster RG, Lucas RJ. Neuropsin (Opn5): a novel opsin identified in mammalian neural tissue. *FEBS Lett.* 2003;554(3):410-6.
95. Yamashita T, Ono K, Ohuchi H, Yumoto A, Gotoh H, Tomonari S, et al. Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. *J Biol Chem.* 2014;289(7):3991-4000.
96. Ota W, Nakane Y, Hattar S, Yoshimura T. Impaired Circadian Photoentrainment in Opn5-Null Mice. *iScience.* 2018;6:299-305.
97. Kornhauser JM, Mayo KE, Takahashi JS. Light, immediate-early genes, and circadian rhythms. *Behav Genet.* 1996;26(3):221-40.
98. Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS. Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron.* 1990;5(2):127-34.
99. Rusak B, McNaughton L, Robertson HA, Hunt SP. Circadian variation in photic regulation of immediate-early gene mRNAs in rat suprachiasmatic nucleus cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992;14(1-2):124-30.
100. Rusak B, Robertson HA, Wisden W, Hunt SP. Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science.* 1990;248(4960):1237-40.
101. Guido ME, Goguen D, De Guido L, Robertson HA, Rusak B. Circadian and photic regulation of immediate-early gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 1999;90(2):555-71.
102. Yoshida K, Kawamura K, Imaki J. Differential expression of c-fos mRNA in rat retinal cells: regulation by light/dark cycle. *Neuron.* 1993;10(6):1049-54.
103. Gudehithlu KP, Neff NH, Hadjiconstantinou M. c-fos and NGFI-A mRNA of rat retina: evidence for light-induced augmentation and a role for cholinergic and glutamate receptors. *Brain Res.* 1993;631(1):77-82.
104. Caputto BL, Guido ME. Immediate early gene expression within the visual system: light and circadian regulation in the retina and the suprachiasmatic nucleus. *Neurochem Res.* 2000;25(1):153-62.
105. Porterfield VM, Piontkivska H, Mintz EM. Identification of novel light-induced genes in the suprachiasmatic nucleus. *BMC Neurosci.* 2007;8:98.
106. Riedel CS, Georg B, Jørgensen HL, Hannibal J, Fahrenkrug J. Mice Lacking EGR1 Have Impaired Clock Gene (BMAL1) Oscillation, Locomotor Activity, and Body Temperature. *J Mol Neurosci.* 2018;64(1):9-19.
107. Porterfield VM, Mintz EM. Temporal patterns of light-induced immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett.* 2009;463(1):70-3.
108. Tosini G, Kasamatsu M, Sakamoto K. Clock gene expression in the rat retina: effects of lighting conditions and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* 2007;1159:134-40.
109. Chen W, Baler R. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;81(1-2):43-50.
110. Ripperger JA, Schibler U. Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nat Genet.* 2006;38(3):369-74.
111. Ripperger JA, Shearman LP, Reppert SM, Schibler U. CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev.* 2000;14(6):679-89.
112. Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab.* 2006;4(1):25-36.
113. Yoshitane H, Asano Y, Sagami A, Sakai S, Suzuki Y, Okamura H, et al. Functional D-box sequences reset the circadian clock and drive mRNA rhythms. *Commun Biol.* 2019;2:300.
114. Yamajuku D, Shibata Y, Kitazawa M, Katakura T, Urata H, Kojima T, et al. Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator. *FEBS Lett.* 2011;585(14):2217-22.
115. Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev.* 2001;15(8):995-1006.
116. Tao W, Wu J, Zhang Q, Lai SS, Jiang S, Jiang C, et al. EGR1 regulates hepatic clock gene amplitude by activating Per1 transcription. *Sci Rep.* 2015;5:15212.
117. Nir I, Agarwal N. Diurnal expression of c-fos in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993;19(1-2):47-54.

118. Haider NB, Mollema N, Gaule M, Yuan Y, Sachs AJ, Nystuen AM, et al. Nr2e3-directed transcriptional regulation of genes involved in photoreceptor development and cell-type specific phototransduction. *Exp Eye Res.* 2009;89(3):365-72.
119. Jia L, Oh EC, Ng L, Srinivas M, Brooks M, Swaroop A, et al. Retinoid-related orphan nuclear receptor RORbeta is an early-acting factor in rod photoreceptor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(41):17534-9.
120. Srinivas M, Ng L, Liu H, Jia L, Forrest D. Activation of the blue opsin gene in cone photoreceptor development by retinoid-related orphan receptor beta. *Mol Endocrinol.* 2006;20(8):1728-41.
121. Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, Fleury-Olela F, Conquet F, Schibler U, et al. Circadian expression of the steroid 15 alpha-hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol Cell Biol.* 1999;19(10):6488-99.
122. Lavery DJ, Schibler U. Circadian transcription of the cholesterol 7 alpha hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes Dev.* 1993;7(10):1871-84.
123. Webber AL, Hodor P, Thut CJ, Vogt TF, Zhang T, Holder DJ, et al. Dual role of Nr2e3 in photoreceptor development and maintenance. *Exp Eye Res.* 2008;87(1):35-48.
124. Mollema NJ, Yuan Y, Jelcick AS, Sachs AJ, von Alpen D, Schorderet D, et al. Nuclear receptor Rev-erb alpha (Nr1d1) functions in concert with Nr2e3 to regulate transcriptional networks in the retina. *PLoS One.* 2011;6(3):e17494.
125. Cheng H, Khanna H, Oh EC, Hicks D, Mitton KP, Swaroop A. Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum Mol Genet.* 2004;13(15):1563-75.
126. Chow L, Levine EM, Reh TA. The nuclear receptor transcription factor, retinoid-related orphan receptor beta, regulates retinal progenitor proliferation. *Mech Dev.* 1998;77(2):149-64.
127. Fu Y, Liu H, Ng L, Kim JW, Hao H, Swaroop A, et al. Feedback induction of a photoreceptor-specific isoform of retinoid-related orphan nuclear receptor β by the rod transcription factor NRL. *J Biol Chem.* 2014;289(47):32469-80.
128. Nikonov SS, Brown BM, Davis JA, Zuniga FI, Bragin A, Pugh EN, Jr., et al. Mouse cones require an arrestin for normal inactivation of phototransduction. *Neuron.* 2008;59(3):462-74.
129. Brown BM, Ramirez T, Rife L, Craft CM. Visual Arrestin 1 contributes to cone photoreceptor survival and light adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(5):2372-80.
130. Xu J, Dodd RL, Makino CL, Simon MI, Baylor DA, Chen J. Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin. *Nature.* 1997;389(6650):505-9.
131. Wilson CJ, Applebury ML. Arresting G-protein coupled receptor activity. *Curr Biol.* 1993;3(10):683-6.
132. Gurevich EV, Gurevich VV. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* 2006;7(9):236.
133. Tosini G, Dirden JC. Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: in vitro evidence. *Neurosci Lett.* 2000;286(2):119-22.
134. Nguyen-Legros J, Chanut E, Versaux-Botteri C, Simon A, Trouvin JH. Dopamine inhibits melatonin synthesis in photoreceptor cells through a D2-like receptor subtype in the rat retina: biochemical and histochemical evidence. *J Neurochem.* 1996;67(6):2514-20.
135. Hwang CK, Chaurasia SS, Jackson CR, Chan GC, Storm DR, Iuvone PM. Circadian rhythm of contrast sensitivity is regulated by a dopamine-neuronal PAS-domain protein 2-adenylyl cyclase 1 signaling pathway in retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 2013;33(38):14989-97.
136. Vancura P, Abdelhadi S, Csicsely E, Baba K, Tosini G, Iuvone PM, et al. Gnaz couples the circadian and dopaminergic system to G protein-mediated signaling in mouse photoreceptors. *PLoS One.* 2017;12(10):e0187411.
137. Parker RO, Crouch RK. Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Exp Eye Res.* 2010;91(6):788-92.
138. Haeseleer F, Jang GF, Imanishi Y, Driessen C, Matsumura M, Nelson PS, et al. Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J Biol Chem.* 2002;277(47):45537-46.

139. Maeda A, Maeda T, Imanishi Y, Sun W, Jastrzebska B, Hatala DA, et al. Retinol dehydrogenase (RDH12) protects photoreceptors from light-induced degeneration in mice. *J Biol Chem*. 2006;281(49):37697-704.
140. Maeda A, Maeda T, Sun W, Zhang H, Baehr W, Palczewski K. Redundant and unique roles of retinol dehydrogenases in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19565-70.
141. Vancura P, Wolloscheck T, Baba K, Tosini G, Iuvone PM, Spessert R. Circadian and Dopaminergic Regulation of Fatty Acid Oxidation Pathway Genes in Retina and Photoreceptor Cells. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164665.
142. Lim SC, Tajika M, Shimura M, Carey KT, Stroud DA, Murayama K, et al. Loss of the Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation Protein Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Disrupts Oxidative Phosphorylation Protein Complex Stability and Function. *Sci Rep*. 2018;8(1):153.
143. Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med*. 2004;25(5-6):495-520.
144. Man PS, Evans T, Carter DA. Rhythmic expression of an egr-1 transgene in rats distinguishes two populations of photoreceptor cells in the retinal outer nuclear layer. *Mol Vis*. 2008;14:1176-86.
145. Mustafi D, Kevany BM, Genoud C, Bai X, Palczewski K. Photoreceptor phagocytosis is mediated by phosphoinositide signaling. *Faseb j*. 2013;27(11):4585-95.
146. Kamphuis W, Dijk F, van Soest S, Bergen AA. Global gene expression profiling of ischemic preconditioning in the rat retina. *Mol Vis*. 2007;13:1020-30.
147. Maxwell MA, Muscat GE. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal*. 2006;4:e002.
148. Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Kutty RK, Wiggert B. Circadian-dependent retinal light damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(12):3694-701.
149. Honkaniemi J, Kononen J, Kainu T, Pyykönen I, Pelto-Huikko M. Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;25(3-4):234-41.
150. Honkaniemi J, Kainu T, Ceccatelli S, Rechardt L, Hökfelt T, Pelto-Huikko M. Fos and jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress. *Neuroreport*. 1992;3(10):849-52.
151. Tosini G, Menaker M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res*. 1998;789(2):221-8.
152. Niki T, Hamada T, Ohtomi M, Sakamoto K, Suzuki S, Kako K, et al. The localization of the site of arylalkylamine N-acetyltransferase circadian expression in the photoreceptor cells of mammalian retina. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;248(1):115-20.
153. Liu C, Fukuhara C, Wessel JH, 3rd, Iuvone PM, Tosini G. Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. *Cell Tissue Res*. 2004;315(2):197-201.
154. Ruan GX, Zhang DQ, Zhou T, Yamazaki S, McMahon DG. Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(25):9703-8.
155. Tosini G, Davidson AJ, Fukuhara C, Kasamatsu M, Castanon-Cervantes O. Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *Faseb j*. 2007;21(14):3866-71.
156. Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Iuvone PM, Tosini G. Intraocular injection of kainic acid does not abolish the circadian rhythm of arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in rat photoreceptors. *Mol Vis*. 2006;12:117-24.
157. Chaurasia SS, Pozdeyev N, Haque R, Visser A, Ivanova TN, Iuvone PM. Circadian clockwork machinery in neural retina: evidence for the presence of functional clock components in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures. *Mol Vis*. 2006;12:215-23.
158. Schneider K, Tippmann S, Spiwox-Becker I, Holthues H, Wolloscheck T, Spatkowski G, et al. Unique clockwork in photoreceptor of rat. *J Neurochem*. 2010;115(3):585-94.
159. Witkovsky P, Veisenberger E, LeSauter J, Yan L, Johnson M, Zhang DQ, et al. Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene Period 1 in the mouse retina. *J Neurosci*. 2003;23(20):7670-6.

160. Ruan GX, Allen GC, Yamazaki S, McMahon DG. An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol.* 2008;6(10):e249.
161. Dorenbos R, Contini M, Hirasawa H, Gustincich S, Raviola E. Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. *Vis Neurosci.* 2007;24(4):573-80.
162. Gustincich S, Contini M, Gariboldi M, Puopolo M, Kadota K, Bono H, et al. Gene discovery in genetically labeled single dopaminergic neurons of the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(14):5069-74.
163. Xu L, Ruan G, Dai H, Liu AC, Penn J, McMahon DG. Mammalian retinal Müller cells have circadian clock function. *Mol Vis.* 2016;22:275-83.
164. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. *Glia.* 2013;61(5):651-78.
165. Tout S, Chan-Ling T, Holländer H, Stone J. The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience.* 1993;55(1):291-301.
166. Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, Francke M, Landiev I, Grosche J, et al. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int.* 2009;54(3-4):143-60.
167. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25(4):397-424.
168. Cahill GM, Besharse JC. Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: regulation by a photoreceptor oscillator. *Progress in retinal and eye research.* 1995;14(1):267-91.
169. Besharse JC, Iuvone PM, Pierce ME. Regulation of rhythmic photoreceptor metabolism: a role for post-receptor neurons. *Progress in retinal research.* 1988;7:21-61.
170. Wiechmann AF, Summers JA. Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(2):137-60.
171. Baba K, Benleulmi-Chaachoua A, Journé AS, Kamal M, Guillaume JL, Dussaud S, et al. Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci Signal.* 2013;6(296):ra89.
172. Baba K, Pozdeyev N, Mazzoni F, Contreras-Alcantara S, Liu C, Kasamatsu M, et al. Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(35):15043-8.
173. Sengupta A, Baba K, Mazzoni F, Pozdeyev NV, Strettoi E, Iuvone PM, et al. Localization of melatonin receptor 1 in mouse retina and its role in the circadian regulation of the electroretinogram and dopamine levels. *PLoS One.* 2011;6(9):e24483.
174. Wiechmann AF, Vrieze MJ, Dighe R, Hu Y. Direct modulation of rod photoreceptor responsiveness through a Mel(1c) melatonin receptor in transgenic *Xenopus laevis* retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(10):4522-31.
175. Wiechmann AF, Yang XL, Wu SM, Hollyfield JG. Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. *Brain Res.* 1988;453(1-2):377-80.
176. Ping Y, Huang H, Zhang XJ, Yang XL. Melatonin potentiates rod signals to ON type bipolar cells in fish retina. *J Physiol.* 2008;586(11):2683-94.
177. Dubocovich ML. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature.* 1983;306(5945):782-4.
178. Doyle SE, Grace MS, Mclvor W, Menaker M. Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Vis Neurosci.* 2002;19(5):593-601.
179. Nir I, Haque R, Iuvone PM. Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina. *Brain Res.* 2000;870(1-2):118-25.
180. Iuvone PM, Galli CL, Garrison-Gund CK, Neff NH. Light stimulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons. *Science.* 1978;202(4370):901-2.
181. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol.* 2004;108(1):17-40.
182. Sibley DR, Monsma FJ, Jr. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13(2):61-9.
183. Cohen AI, Todd RD, Harmon S, O'Malley KL. Photoreceptors of mouse retinas possess D4 receptors coupled to adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):12093-7.
184. Zawilska JB, Derbiszewska T, Sek B, Nowak JZ. Dopamine-dependent cyclic AMP generating system in chick retina and its relation to melatonin biosynthesis. *Neurochem Int.* 1995;27(6):535-43.
185. Zawilska JB, Nowak JZ. Does D4 dopamine receptor mediate the inhibitory effect of light on melatonin biosynthesis in chick retina? *Neurosci Lett.* 1994;166(2):203-6.

186. Storch KF, Paz C, Signorovitch J, Raviola E, Pawlyk B, Li T, et al. Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell*. 2007;130(4):730-41.
187. Manglapus MK, Uchiyama H, Buelow NF, Barlow RB. Circadian rhythms of rod-cone dominance in the Japanese quail retina. *J Neurosci*. 1998;18(12):4775-84.
188. Barnard AR, Hattar S, Hankins MW, Lucas RJ. Melanopsin regulates visual processing in the mouse retina. *Curr Biol*. 2006;16(4):389-95.
189. Terman JS, Remé CE, Terman M. Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. 1993;605(2):256-64.
190. Teirstein PS, Goldman AI, O'Brien PJ. Evidence for both local and central regulation of rat rod outer segment disc shedding. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1980;19(11):1268-73.
191. Besharse JC, Hollyfield JG, Rayborn ME. Turnover of rod photoreceptor outer segments. II. Membrane addition and loss in relationship to light. *J Cell Biol*. 1977;75(2 Pt 1):507-27.
192. von Schantz M, Lucas RJ, Foster RG. Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;72(1):108-14.
193. Martin JR, Fuchs A, Bender R, Harting J. Altered light/dark activity difference with aging in two rat strains. *J Gerontol*. 1986;41(1):2-7.
194. Penev PD, Zee PC, Turek FW. Quantitative analysis of the age-related fragmentation of hamster 24-h activity rhythms. *Am J Physiol*. 1997;273(6):R2132-7.
195. van Gool WA, Witting W, Mirmiran M. Age-related changes in circadian sleep-wakefulness rhythms in male rats isolated from time cues. *Brain Res*. 1987;413(2):384-7.
196. Banks G, Heise I, Starbuck B, Osborne T, Wisby L, Potter P, et al. Genetic background influences age-related decline in visual and nonvisual retinal responses, circadian rhythms, and sleep. *Neurobiol Aging*. 2015;36(1):380-93.
197. Pittendrigh CS, Daan S. Circadian oscillations in rodents: a systematic increase of their frequency with age. *Science*. 1974;186(4163):548-50.
198. Rosenberg RS, Zee PC, Turek FW. Phase response curves to light in young and old hamsters. *Am J Physiol*. 1991;261(2 Pt 2):R491-5.
199. Zhang Y, Brainard GC, Zee PC, Pinto LH, Takahashi JS, Turek FW. Effects of aging on lens transmittance and retinal input to the suprachiasmatic nucleus in golden hamsters. *Neurosci Lett*. 1998;258(3):167-70.
200. Weinert H, Weinert D, Schurov I, Maywood ES, Hastings MH. Impaired expression of the mPer2 circadian clock gene in the suprachiasmatic nuclei of aging mice. *Chronobiol Int*. 2001;18(3):559-65.
201. Sellix MT, Evans JA, Leise TL, Castanon-Cervantes O, Hill DD, DeLisser P, et al. Aging differentially affects the re-entrainment response of central and peripheral circadian oscillators. *J Neurosci*. 2012;32(46):16193-202.
202. Zhao J, Warman GR, Cheeseman JF. The functional changes of the circadian system organization in aging. *Ageing Res Rev*. 2019;52:64-71.
203. Turner PL, Mainster MA. Circadian photoreception: ageing and the eye's important role in systemic health. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(11):1439-44.
204. Semo M, Peirson S, Lupi D, Lucas RJ, Jeffery G, Foster RG. Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci*. 2003;17(9):1793-801.
205. Welz PS, Benitah SA. Molecular Connections Between Circadian Clocks and Aging. *J Mol Biol*. 2020;432(12):3661-79.
206. Van Reeth O, Zhang Y, Zee PC, Turek FW. Grafting fetal suprachiasmatic nuclei in the hypothalamus of old hamsters restores responsiveness of the circadian clock to a phase shifting stimulus. *Brain Res*. 1994;643(1-2):338-42.
207. Li H, Satinoff E. Fetal tissue containing the suprachiasmatic nucleus restores multiple circadian rhythms in old rats. *Am J Physiol*. 1998;275(6):R1735-44.
208. Cai A, Lehman MN, Lloyd JM, Wise PM. Transplantation of fetal suprachiasmatic nuclei into middle-aged rats restores diurnal Fos expression in host. *Am J Physiol*. 1997;272(1 Pt 2):R422-8.
209. Turek FW, Penev P, Zhang Y, van Reeth O, Zee P. Effects of age on the circadian system. *Neurosci Biobehav Rev*. 1995;19(1):53-8.

210. Buijink MR, Olde Engberink AHO, Wit CB, Almog A, Meijer JH, Rohling JHT, et al. Aging Affects the Capacity of Photoperiodic Adaptation Downstream from the Central Molecular Clock. *J Biol Rhythms*. 2020;35(2):167-79.
211. Buijink MR, Michel S. A multi-level assessment of the bidirectional relationship between aging and the circadian clock. *J Neurochem*. 2021;157(1):73-94.
212. Farajnia S, Meijer JH, Michel S. Age-related changes in large-conductance calcium-activated potassium channels in mammalian circadian clock neurons. *Neurobiol Aging*. 2015;36(6):2176-83.
213. Satinoff E, Li H, Tchong TK, Liu C, McArthur AJ, Medanic M, et al. Do the suprachiasmatic nuclei oscillate in old rats as they do in young ones? *Am J Physiol*. 1993;265(5 Pt 2):R1216-22.
214. Watanabe A, Shibata S, Watanabe S. Circadian rhythm of spontaneous neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of old hamster in vitro. *Brain Res*. 1995;695(2):237-9.
215. Aujard F, Herzog ED, Block GD. Circadian rhythms in firing rate of individual suprachiasmatic nucleus neurons from adult and middle-aged mice. *Neuroscience*. 2001;106(2):255-61.
216. Nygård M, Hill RH, Wikström MA, Kristensson K. Age-related changes in electrophysiological properties of the mouse suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res Bull*. 2005;65(2):149-54.
217. Bonaconsa M, Malpeli G, Montaruli A, Carandente F, Grassi-Zucconi G, Bentivoglio M. Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice. *Exp Gerontol*. 2014;55:70-9.
218. Asai M, Yoshinobu Y, Kaneko S, Mori A, Nikaido T, Moriya T, et al. Circadian profile of *Per* gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats. *J Neurosci Res*. 2001;66(6):1133-9.
219. Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD. Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10801-6.
220. Nakamura TJ, Nakamura W, Tokuda IT, Ishikawa T, Kudo T, Colwell CS, et al. Age-Related Changes in the Circadian System Unmasked by Constant Conditions. *eNeuro*. 2015;2(4).
221. Woods WH, Powell EW, Andrews A, Ford CW, Jr. Light and electron microscopic analysis of two divisions of the suprachiasmatic nucleus in the young and aged rat. *Anat Rec*. 1993;237(1):71-88.
222. Madeira MD, Sousa N, Santer RM, Paula-Barbosa MM, Gundersen HJ. Age and sex do not affect the volume, cell numbers, or cell size of the suprachiasmatic nucleus of the rat: an unbiased stereological study. *J Comp Neurol*. 1995;361(4):585-601.
223. Roozendaal B, van Gool WA, Swaab DF, Hoogendijk JE, Mirmiran M. Changes in vasopressin cells of the rat suprachiasmatic nucleus with aging. *Brain Res*. 1987;409(2):259-64.
224. Peng MT, Hsü HK. No neuron loss from hypothalamic nuclei of old male rats. *Gerontology*. 1982;28(1):19-22.
225. Chee CA, Roozendaal B, Swaab DF, Goudsmit E, Mirmiran M. Vasoactive intestinal polypeptide neuron changes in the senile rat suprachiasmatic nucleus. *Neurobiol Aging*. 1988;9(3):307-12.
226. Krajnak K, Kashon ML, Rosewell KL, Wise PM. Aging alters the rhythmic expression of vasoactive intestinal polypeptide mRNA but not arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei of female rats. *J Neurosci*. 1998;18(12):4767-74.
227. Duncan MJ, Herron JM, Hill SA. Aging selectively suppresses vasoactive intestinal peptide messenger RNA expression in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;87(2):196-203.
228. Kalamatianos T, Kalló I, Coen CW. Ageing and the diurnal expression of the mRNAs for vasopressin and for the V1a and V1b vasopressin receptors in the suprachiasmatic nucleus of male rats. *J Neuroendocrinol*. 2004;16(6):493-501.
229. Kawakami F, Okamura H, Tamada Y, Maebayashi Y, Fukui K, Ibata Y. Loss of day-night differences in VIP mRNA levels in the suprachiasmatic nucleus of aged rats. *Neurosci Lett*. 1997;222(2):99-102.

230. Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, Waschek J, Herzog ED. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci.* 2005;8(4):476-83.
231. Maywood ES, Reddy AB, Wong GK, O'Neill JS, O'Brien JA, McMahon DG, et al. Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol.* 2006;16(6):599-605.
232. Maywood ES. Synchronization and maintenance of circadian timing in the mammalian clockwork. *Eur J Neurosci.* 2020;51(1):229-40.
233. Abraham U, Granada AE, Westermark PO, Heine M, Kramer A, Herzel H. Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Mol Syst Biol.* 2010;6:438.
234. Liu C, Reppert SM. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron.* 2000;25(1):123-8.
235. Evans JA, Leise TL, Castanon-Cervantes O, Davidson AJ. Dynamic interactions mediated by nonredundant signaling mechanisms couple circadian clock neurons. *Neuron.* 2013;80(4):973-83.
236. Nygård M, Palomba M. The GABAergic network in the suprachiasmatic nucleus as a key regulator of the biological clock: does it change during senescence? *Chronobiol Int.* 2006;23(1-2):427-35.
237. Palomba M, Nygård M, Florenzano F, Bertini G, Kristensson K, Bentivoglio M. Decline of the presynaptic network, including GABAergic terminals, in the aging suprachiasmatic nucleus of the mouse. *J Biol Rhythms.* 2008;23(3):220-31.
238. Benloucif S, Masana MI, Dubocovich ML. Light-induced phase shifts of circadian activity rhythms and immediate early gene expression in the suprachiasmatic nucleus are attenuated in old C3H/HeN mice. *Brain Res.* 1997;747(1):34-42.
239. Zhang Y, Kornhauser JM, Zee PC, Mayo KE, Takahashi JS, Turek FW. Effects of aging on light-induced phase-shifting of circadian behavioral rhythms, fos expression and CREB phosphorylation in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 1996;70(4):951-61.
240. Biello SM. Circadian clock resetting in the mouse changes with age. *Age (Dordr).* 2009;31(4):293-303.
241. Biello SM, Bonsall DR, Atkinson LA, Molyneux PC, Harrington ME, Lall GS. Alterations in glutamatergic signaling contribute to the decline of circadian photoentrainment in aged mice. *Neurobiol Aging.* 2018;66:75-84.
242. Verma AK, Khan MI, Ashfaq F, Rizvi SI. Crosstalk Between Aging, Circadian Rhythm, and Melatonin. *Rejuvenation Res.* 2023;26(6):229-41.
243. Sutin EL, Dement WC, Heller HC, Kilduff TS. Light-induced gene expression in the suprachiasmatic nucleus of young and aging rats. *Neurobiol Aging.* 1993;14(5):441-6.
244. Polidarová L, Sládek M, Novosadová Z, Sumová A. Aging does not compromise in vitro oscillation of the suprachiasmatic nuclei but makes it more vulnerable to constant light. *Chronobiol Int.* 2017;34(1):105-17.
245. Panagiotou M, Michel S, Meijer JH, Deboer T. The aging brain: sleep, the circadian clock and exercise. *Biochem Pharmacol.* 2021;191:114563.
246. Hood S, Amir S. The aging clock: circadian rhythms and later life. *J Clin Invest.* 2017;127(2):437-46.
247. Baba K, Tosini G. Aging Alters Circadian Rhythms in the Mouse Eye. *J Biol Rhythms.* 2018;33(4):441-5.
248. Baba K, Mazzoni F, Owino S, Contreras-Alcantara S, Strettoi E, Tosini G. Age-related changes in the daily rhythm of photoreceptor functioning and circuitry in a melatonin-proficient mouse strain. *PLoS One.* 2012;7(5):e37799.
249. Baba K, Piano I, Lyuboslavsky P, Chrenek MA, Sellers JT, Zhang S, et al. Removal of clock gene *Bmal1* from the retina affects retinal development and accelerates cone photoreceptor degeneration during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(51):13099-104.
250. Li C, Cheng M, Yang H, Peachey NS, Naash MI. Age-related changes in the mouse outer retina. *Optom Vis Sci.* 2001;78(6):425-30.
251. Gresh J, Goletz PW, Crouch RK, Rohrer B. Structure-function analysis of rods and cones in juvenile, adult, and aged C57bl/6 and Balb/c mice. *Vis Neurosci.* 2003;20(2):211-20.
252. Cavallotti C, Artico M, Pescosolido N, Feher J. Age-related changes in rat retina. *Jpn J Ophthalmol.* 2001;45(1):68-75.

253. Danias J, Lee KC, Zamora MF, Chen B, Shen F, Filippopoulos T, et al. Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2NNia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(12):5151-62.
254. Katz ML, Robison WG, Jr. Evidence of cell loss from the rat retina during senescence. *Exp Eye Res.* 1986;42(4):293-304.
255. Semo M, Lupi D, Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Light-induced c-fos in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci.* 2003;18(11):3007-17.
256. Baba K, Ribelayga CP, Michael Iuvone P, Tosini G. The Retinal Circadian Clock and Photoreceptor Viability. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1074:345-50.
257. Joshi CJ, Ke W, Drangowska-Way A, O'Rourke EJ, Lewis NE. What are housekeeping genes? *PLoS computational biology.* 2022;18(7):e1010295.
258. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology.* 1999;75(2-3):291-5.
259. Zhang Y, Li D, Sun B. Do housekeeping genes exist? *PloS one.* 2015;10(5):e0123691.
260. Refinetti R, Lissen GC, Halberg F. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res.* 2007;38(4):275-325.
261. Lentz MJ. Time-series analysis--cosinor analysis: a special case. *West J Nurs Res.* 1990;12(3):408-12.
262. Lee JH, Moon E, Park J, Oh CE, Hong YR, Yoon M. Optimization of Analysis of Circadian Rest-Activity Rhythm Using Cosinor Analysis in Mice. *Psychiatry Investig.* 2022;19(5):380-5.
263. Doyle MM, Murphy TE, Miner B, Pisani MA, Luszczek ER, Knauert MP. Enhancing cosinor analysis of circadian phase markers using the gamma distribution. *Sleep Med.* 2022;92:1-3.
264. Cornelissen G. Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Med Model.* 2014;11:16.
265. Sachs M. Tools for estimating and predicting the cosinor model. Version; 2015.
266. Foundation TR. The R Project for Statistical Computing 2024 [Available from: <https://www.r-project.org/>].
267. Flurkey K, Currer JM, Harrison D. Mouse models in aging research. *The mouse in biomedical research: Elsevier; 2007.* p. 637-72.
268. Weinert D. Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiol Int.* 2000;17(3):261-83.
269. Satinoff E. Patterns of circadian body temperature rhythms in aged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998;25(2):135-40.
270. Wachulec M, Peloso E, Satinoff E. Individual differences in response to LPS and psychological stress in aged rats. *Am J Physiol.* 1997;272(4 Pt 2):R1252-7.
271. Wang J, Symul L, Yeung J, Gobet C, Sobel J, Lück S, et al. Circadian clock-dependent and -independent posttranscriptional regulation underlies temporal mRNA accumulation in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(8):E1916-e25.
272. Lipton JO, Yuan ED, Boyle LM, Ebrahimi-Fakhari D, Kwiatkowski E, Nathan A, et al. The Circadian Protein BMAL1 Regulates Translation in Response to S6K1-Mediated Phosphorylation. *Cell.* 2015;161(5):1138-51.
273. Mauvoisin D, Wang J, Jouffe C, Martin E, Atger F, Waridel P, et al. Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(1):167-72.
274. Reddy AB, Karp NA, Maywood ES, Sage EA, Deery M, O'Neill JS, et al. Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr Biol.* 2006;16(11):1107-15.
275. Dinet V, Ansari N, Torres-Farfan C, Korf HW. Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J Pineal Res.* 2007;42(1):83-91.
276. Kunst S, Wolloscheck T, Kelleher DK, Wolfrum U, Sargsyan SA, Iuvone PM, et al. Pgc-1 α and Nr4a1 Are Target Genes of Circadian Melatonin and Dopamine Release in Murine Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(10):6084-94.

277. Hiragaki S, Baba K, Coulson E, Kunst S, Spessert R, Tosini G. Melatonin signaling modulates clock genes expression in the mouse retina. *PLoS One*. 2014;9(9):e106819.
278. Ruan GX, Gamble KL, Risner ML, Young LA, McMahon DG. Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *PLoS One*. 2012;7(6):e38985.
279. Kamphuis W, Cailotto C, Dijk F, Bergen A, Buijs RM. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(1):18-26.
280. Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell*. 1997;91(7):1055-64.
281. Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*. 1998;20(6):1103-10.
282. Jackson CR, Chaurasia SS, Hwang CK, Iuvone PM. Dopamine D₄ receptor activation controls circadian timing of the adenylyl cyclase 1/cyclic AMP signaling system in mouse retina. *Eur J Neurosci*. 2011;34(1):57-64.
283. Klitten LL, Rath MF, Coon SL, Kim JS, Klein DC, Møller M. Localization and regulation of dopamine receptor D4 expression in the adult and developing rat retina. *Exp Eye Res*. 2008;87(5):471-7.
284. Agarwal N. Diurnal expression of NGF1-A mRNA in retinal degeneration slow (rds) mutant mouse retina. *FEBS Lett*. 1994;339(3):253-7.
285. Humphries A, Carter DA. Circadian dependency of nocturnal immediate-early protein induction in rat retina. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(2):551-6.
286. Bai L, Zimmer S, Rickes O, Rohleder N, Holthues H, Engel L, et al. Daily oscillation of gene expression in the retina is phase-advanced with respect to the pineal gland. *Brain Res*. 2008;1203:89-96.
287. Peirson SN, Butler JN, Duffield GE, Takher S, Sharma P, Foster RG. Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(4):800-7.
288. Rovsing L, Møller M. Photic stimulation of the suprachiasmatic nucleus via the non-visual optic system. A gene expression study in the blind *Crx*^{-/-} mouse. *Cell Tissue Res*. 2014;358(1):239-48.
289. Duncan TE, O'Steen WK. The diurnal susceptibility of rat retinal photoreceptors to light-induced damage. *Exp Eye Res*. 1985;41(4):497-507.
290. Duncan MJ. Aging of the mammalian circadian timing system: Changes in the central pacemaker and its regulation by photic and nonphotic signals. *Neuroembryology and Aging*. 2007;4(1-2):85-101.
291. Hankins MW. Functional dopamine deficits in the senile rat retina. *Vis Neurosci*. 2000;17(6):839-45.
292. Giorgi O, Pibiri M, Dal Toso R, Toffano G, Biggio G. Differential turnover rates of D1 dopamine receptors in the brain and retina of adult and senescent rats. *Neurochemistry international*. 1992;20:171-3.
293. Govoni S, Loddo P, Spano P, Trabucchi M. Dopamine receptor sensitivity in brain and retina of rats during aging. *Brain research*. 1977;138(3):565-70.

8 Anhang

8.1 Tageszeitliche Expressionsprofile 70 und 365 Tage alter Mäuse (Werte)

18S 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0	9,61E+05	9,42E+05	2,21E+06	2,13E+06	8,31E+05	8,43E+05	1,49E+06	1,46E+06
3	1,10E+06	1,18E+06	2,31E+06	2,56E+06	8,37E+05	8,58E+05	1,87E+06	1,81E+06
6	1,02E+06	1,02E+06	2,13E+06	2,13E+06	9,35E+05	9,15E+05	2,15E+06	2,05E+06
9	1,07E+06	1,04E+06	2,50E+06	2,40E+06	8,87E+05	8,91E+05	1,64E+06	1,66E+06
12	1,19E+06	1,20E+06	7,32E+05	7,10E+05	8,60E+05	9,18E+05	6,96E+05	6,94E+05
15	9,44E+05	9,95E+05	1,77E+06	2,03E+06	2,06E+06	2,10E+06	1,33E+06	1,41E+06
18	9,62E+05	1,01E+06	2,24E+06	2,35E+06	3,18E+06	3,15E+06	1,52E+06	1,55E+06
21	1,15E+06	1,17E+06	2,18E+06	2,26E+06	3,41E+06	3,43E+06	1,55E+06	1,67E+06

18S 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0	1,79E+06	1,94E+06	1,47E+06	1,50E+06	1,70E+06	1,86E+06	1,89E+06	1,88E+06
3	2,07E+06	2,14E+06	1,76E+06	1,83E+06	1,59E+06	1,69E+06	1,87E+06	1,98E+06
6	2,17E+06	2,16E+06	1,78E+06	1,51E+06	1,62E+06	1,69E+06	1,75E+06	1,61E+06
9	2,08E+06	2,20E+06	1,71E+06	1,68E+06	1,70E+06	1,87E+06	2,22E+06	2,31E+06
12	2,01E+06	1,96E+06	1,63E+06	1,67E+06	1,77E+06	1,85E+06	1,58E+06	1,47E+06
15	1,88E+06	2,03E+06	1,75E+06	1,89E+06	1,97E+06	2,20E+06	2,43E+06	2,58E+06
18	2,54E+06	2,51E+06	1,55E+06	1,63E+06	1,44E+06	1,51E+06	2,15E+06	2,25E+06
21	2,30E+06	2,15E+06	1,66E+06	1,76E+06	1,73E+06	1,74E+06	2,23E+06	2,42E+06

Acadm 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0	4,84E+03	4,82E+03	4,95E+03	4,96E+03	4,45E+03	4,62E+03	7,96E+05	8,47E+05
3	5,85E+03	5,93E+03	7,66E+03	8,45E+03	7,89E+03	8,00E+03	1,05E+06	1,08E+06
6	7,85E+03	8,29E+03	9,38E+03	9,27E+03	7,88E+03	7,73E+03	1,38E+06	1,41E+06
9	8,62E+03	8,97E+03	9,14E+03	9,09E+03	7,13E+03	7,22E+03	8,38E+05	8,96E+05
12	7,83E+03	8,31E+03	6,06E+03	6,70E+03	7,55E+03	7,60E+03	5,69E+05	5,82E+05
15	5,64E+03	5,95E+03	4,28E+03	4,77E+03	5,41E+03	5,88E+03	8,14E+05	8,84E+05
18	4,70E+03	4,61E+03	2,41E+03	2,53E+03	4,20E+03	4,35E+03	1,11E+06	1,18E+06
21	3,46E+03	3,17E+03	3,06E+03	3,21E+03	4,78E+03	4,69E+03	9,42E+05	9,76E+05

Acadm 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0	5,46E+03	5,43E+03	6,11E+03	6,33E+03	7,15E+03	7,14E+03	7,93E+03	8,07E+03
3	1,00E+04	1,06E+04	1,10E+04	1,07E+04	8,95E+03	9,10E+03	1,07E+04	1,10E+04
6	1,22E+04	1,25E+04	1,12E+04	1,19E+04	1,15E+04	1,16E+04	1,47E+04	1,50E+04
9	1,25E+04	1,24E+04	9,67E+03	9,17E+03	1,04E+04	1,06E+04	9,68E+03	9,19E+03
12	1,12E+04	1,09E+04	9,94E+03	9,97E+03	8,26E+03	8,18E+03	7,79E+03	7,79E+03
15	8,94E+03	8,76E+03	5,51E+03	5,71E+03	6,28E+03	6,13E+03	6,94E+03	7,11E+03
18	4,95E+03	5,03E+03	4,68E+03	4,85E+03	4,90E+03	5,04E+03	6,10E+03	6,45E+03
21	5,78E+03	5,75E+03	3,74E+03	3,56E+03	4,47E+03	4,36E+03	5,70E+03	5,26E+03

Arr1 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0	2,71E+05	3,51E+05	3,07E+05	3,22E+05	2,96E+05	3,11E+05	2,90E+05	2,93E+05
3	3,50E+05	3,66E+05	3,76E+05	3,98E+05	3,95E+05	4,08E+05	4,35E+05	4,59E+05
6	4,96E+05	4,66E+05	4,38E+05	4,58E+05	4,45E+05	4,60E+05	5,11E+05	5,47E+05
9	5,47E+05	5,78E+05	5,21E+05	5,33E+05	4,33E+05	4,24E+05	5,29E+05	5,15E+05
12	3,93E+05	4,29E+05	2,75E+05	2,74E+05	4,16E+05	4,51E+05	3,31E+05	3,09E+05
15	3,93E+05	4,17E+05	3,66E+05	3,98E+05	4,11E+05	4,60E+05	3,57E+05	4,03E+05
18	2,46E+05	2,39E+05	2,23E+05	2,35E+05	2,82E+05	2,71E+05	2,74E+05	2,86E+05
21	2,62E+05	2,67E+05	2,57E+05	2,66E+05	3,59E+05	3,70E+05	3,12E+05	3,34E+05

Arr1 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,51E+05	2,64E+05	3,90E+05	3,73E+05	3,63E+05	3,85E+05	3,78E+05	3,78E+05
3	3,87E+05	4,57E+05	5,37E+05	5,46E+05	4,87E+05	5,35E+05	4,87E+05	4,76E+05
6	4,75E+05	4,88E+05	5,13E+05	4,59E+05	4,94E+05	4,91E+05	5,85E+05	5,47E+05
9	6,09E+05	4,93E+05	5,37E+05	5,83E+05	5,48E+05	6,16E+05	5,03E+05	5,03E+05
12	5,56E+05	5,25E+05	5,09E+05	5,30E+05	4,56E+05	4,33E+05	5,32E+05	5,49E+05
15	4,95E+05	5,33E+05	3,96E+05	4,01E+05	4,22E+05	4,18E+05	3,90E+05	4,12E+05
18	2,83E+05	2,80E+05	2,26E+05	2,25E+05	3,60E+05	3,65E+05	3,08E+05	3,15E+05
21	3,53E+05	3,41E+05	5,17E+05	5,48E+05	3,23E+05	3,06E+05	2,64E+05	2,73E+05

Arr4 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	6,66E+03	7,04E+03	7,12E+03	7,36E+03	8,83E+03	9,01E+03	6,87E+03	7,08E+03
3	6,49E+03	6,69E+03	6,09E+03	6,17E+03	7,14E+03	7,71E+03	7,41E+03	7,88E+03
6	1,35E+04	1,31E+04	1,08E+04	1,02E+04	1,52E+04	1,47E+04	1,45E+04	1,45E+04
9	1,52E+04	1,59E+04	1,48E+04	1,51E+04	1,34E+04	1,41E+04	1,48E+04	1,66E+04
12	1,41E+04	1,41E+04	9,90E+03	1,02E+04	1,47E+04	1,50E+04	1,05E+04	1,05E+04
15	1,28E+04	1,34E+04	1,31E+04	1,45E+04	1,45E+04	1,50E+04	1,36E+04	1,45E+04
18	8,38E+03	8,99E+03	8,44E+03	9,02E+03	9,80E+03	1,04E+04	1,08E+04	1,15E+04
21	5,48E+03	5,50E+03	5,49E+03	5,69E+03	8,33E+03	8,41E+03	7,71E+03	7,75E+03

Arr4 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	6,48E+03	6,54E+03	8,14E+03	8,18E+03	8,10E+03	8,05E+03	7,36E+03	7,52E+03
3	7,14E+03	7,68E+03	7,06E+03	7,43E+03	7,06E+03	7,60E+03	7,63E+03	8,00E+03
6	1,06E+04	1,12E+04	1,29E+04	1,22E+04	1,18E+04	1,20E+04	1,51E+04	1,46E+04
9	1,65E+04	1,58E+04	1,53E+04	1,56E+04	1,58E+04	1,50E+04	1,18E+04	1,19E+04
12	1,53E+04	1,51E+04	1,92E+04	1,95E+04	1,03E+04	1,16E+04	1,85E+04	1,77E+04
15	1,16E+04	1,20E+04	8,21E+03	8,68E+03	1,13E+04	1,22E+04	1,30E+04	1,35E+04
18	1,10E+04	1,07E+04	1,13E+04	1,14E+04	1,47E+04	1,47E+04	1,13E+04	1,13E+04
21	7,69E+03	7,68E+03	6,76E+03	6,80E+03	7,89E+03	7,77E+03	6,46E+03	6,55E+03

c-Fos 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,37E+03	1,39E+03	2,44E+03	2,45E+03	2,39E+03	2,40E+03	1,44E+03	1,42E+03
3	1,40E+03	1,43E+03	1,80E+03	1,75E+03	2,25E+03	2,28E+03	2,31E+03	2,30E+03
6	1,23E+03	1,21E+03	1,25E+03	1,20E+03	1,88E+03	1,88E+03	3,10E+03	2,96E+03
9	2,15E+03	2,10E+03	2,42E+03	2,31E+03	1,97E+03	1,97E+03	2,91E+03	2,86E+03
12	4,14E+03	4,31E+03	1,66E+03	1,68E+03	2,39E+03	2,71E+03	1,52E+03	1,64E+03
15	5,74E+03	5,77E+03	8,82E+03	9,63E+03	8,03E+03	8,91E+03	7,24E+03	7,62E+03
18	4,00E+03	3,87E+03	2,30E+03	2,34E+03	5,43E+03	5,55E+03	7,35E+03	7,48E+03
21	1,43E+03	1,35E+03	1,71E+03	1,81E+03	2,21E+03	2,21E+03	2,33E+03	2,34E+03

c-Fos 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,35E+03	1,35E+03	1,27E+03	1,37E+03	2,93E+03	3,12E+03	2,60E+03	2,98E+03
3	3,31E+03	3,30E+03	1,25E+03	1,20E+03	1,50E+03	1,57E+03	2,22E+03	2,15E+03
6	1,04E+03	1,03E+03	1,66E+03	1,72E+03	2,03E+03	1,99E+03	2,46E+03	2,58E+03
9	1,52E+03	1,51E+03	1,70E+03	1,52E+03	2,57E+03	2,53E+03	1,74E+03	1,75E+03
12	9,54E+03	9,59E+03	2,07E+03	2,14E+03	1,33E+03	1,23E+03	4,74E+03	4,79E+03
15	1,05E+04	9,98E+03	4,59E+03	4,50E+03	7,67E+03	7,22E+03	2,05E+04	2,07E+04
18	7,04E+03	7,11E+03	7,42E+03	7,14E+03	8,38E+03	8,52E+03	1,31E+03	1,33E+03
21	2,90E+03	2,82E+03	4,62E+03	4,26E+03	2,67E+03	2,69E+03	6,02E+03	5,50E+03

Cpt1a 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	8,36E+02	8,84E+02	1,85E+03	1,89E+03	7,72E+02	7,98E+02	4,86E+02	4,92E+02
3	1,93E+03	2,01E+03	3,38E+03	3,40E+03	2,31E+03	2,56E+03	2,43E+03	2,53E+03
6	1,71E+03	1,84E+03	1,84E+03	1,84E+03	2,55E+03	2,66E+03	4,91E+03	4,31E+03
9	1,99E+03	2,07E+03	2,94E+03	2,92E+03	1,37E+03	1,52E+03	2,32E+03	2,40E+03
12	2,92E+03	3,18E+03	5,56E+02	6,37E+02	1,26E+03	1,36E+03	1,57E+02	1,59E+02
15	8,70E+02	9,34E+02	1,56E+03	1,62E+03	8,79E+02	9,29E+02	8,91E+02	9,67E+02
18	8,80E+02	8,97E+02	7,91E+02	8,02E+02	1,42E+03	1,43E+03	1,27E+03	1,29E+03
21	7,20E+02	7,07E+02	8,94E+02	8,54E+02	9,83E+02	9,68E+02	1,48E+03	1,56E+03

Cpt1a 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	7,33E+02	7,07E+02	9,12E+02	9,80E+02	1,51E+03	1,54E+03	2,40E+03	2,57E+03
3	2,48E+03	2,59E+03	2,09E+03	2,18E+03	1,54E+03	1,61E+03	2,52E+03	2,60E+03
6	1,72E+03	1,76E+03	3,46E+03	3,61E+03	2,27E+03	2,44E+03	3,60E+03	3,78E+03
9	1,75E+03	1,83E+03	2,02E+03	1,96E+03	1,97E+03	2,07E+03	2,01E+03	1,95E+03
12	3,68E+03	3,69E+03	1,47E+03	1,46E+03	7,14E+02	7,49E+02	2,60E+03	2,57E+03
15	1,17E+03	1,08E+03	5,82E+02	6,28E+02	7,61E+02	7,53E+02	1,99E+03	2,01E+03
18	1,03E+03	1,09E+03	1,40E+03	1,48E+03	8,34E+02	8,30E+02	2,23E+03	2,36E+03
21	9,32E+02	9,93E+02	1,15E+03	1,06E+03	7,16E+02	7,05E+02	2,32E+03	2,16E+03

Dbp 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	7,45E+00	7,66E+00	6,78E+00	7,19E+00	8,03E+00	8,15E+00	5,55E+00	5,91E+00
3	7,93E+00	8,46E+00	8,41E+00	9,35E+00	1,26E+01	1,45E+01	1,22E+01	1,32E+01
6	1,19E+01	1,12E+01	1,14E+01	1,16E+01	1,69E+01	1,66E+01	2,10E+01	2,25E+01
9	1,40E+01	1,51E+01	1,63E+01	1,62E+01	1,62E+01	1,52E+01	1,62E+01	1,68E+01
12	8,90E+00	1,02E+01	3,98E+00	4,33E+00	9,91E+00	1,10E+01	3,60E+00	3,55E+00
15	7,66E+00	8,64E+00	8,09E+00	1,05E+01	1,04E+01	1,20E+01	8,12E+00	9,79E+00
18	5,16E+00	4,91E+00	5,86E+00	6,17E+00	7,99E+00	7,86E+00	6,91E+00	8,33E+00
21	3,73E+00	3,78E+00	3,92E+00	4,10E+00	7,59E+00	7,33E+00	6,97E+00	8,16E+00

Dbp 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	3,94E+00	4,30E+00	1,11E+01	1,13E+01	1,03E+01	1,17E+01	9,89E+00	1,07E+01
3	1,05E+01	1,21E+01	1,34E+01	1,29E+01	9,46E+00	1,18E+01	1,38E+01	1,42E+01
6	1,11E+01	1,19E+01	1,58E+01	1,15E+01	1,27E+01	1,40E+01	1,58E+01	1,48E+01
9	1,37E+01	1,74E+01	1,40E+01	1,45E+01	1,49E+01	1,52E+01	1,16E+01	1,22E+01
12	9,86E+00	9,68E+00	1,05E+01	1,14E+01	6,97E+00	6,75E+00	1,39E+01	1,51E+01
15	9,22E+00	8,34E+00	6,06E+00	6,12E+00	7,51E+00	8,44E+00	1,10E+01	1,23E+01
18	6,65E+00	6,24E+00	5,92E+00	6,46E+00	1,03E+01	9,79E+00	8,31E+00	9,49E+00
21	5,35E+00	4,95E+00	4,51E+00	4,59E+00	5,78E+00	5,15E+00	5,92E+00	7,16E+00

Dec1 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,76E+05	1,75E+05	2,17E+05	2,25E+05	1,30E+05	1,33E+05	9,71E+04	9,57E+04
3	1,69E+05	1,76E+05	2,30E+05	2,35E+05	1,82E+05	1,92E+05	1,82E+05	1,84E+05
6	1,73E+05	1,75E+05	1,80E+05	1,78E+05	2,50E+05	2,50E+05	3,93E+05	3,94E+05
9	2,25E+05	2,35E+05	3,25E+05	3,13E+05	1,52E+05	1,58E+05	2,23E+05	2,23E+05
12	2,86E+05	2,87E+05	7,51E+04	7,34E+04	1,58E+05	1,62E+05	4,17E+04	4,20E+04
15	1,27E+05	1,35E+05	2,25E+05	2,36E+05	1,79E+05	1,95E+05	1,38E+05	1,50E+05
18	1,12E+05	1,15E+05	2,02E+05	2,09E+05	2,55E+05	2,61E+05	1,86E+05	1,98E+05
21	1,00E+05	1,04E+05	1,55E+05	1,37E+05	1,53E+05	1,58E+05	1,63E+05	1,71E+05

Dec1 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	9,34E+04	9,46E+04	1,57E+05	1,60E+05	1,93E+05	1,93E+05	2,05E+05	2,05E+05
3	2,00E+05	2,07E+05	1,76E+05	1,86E+05	1,52E+05	1,61E+05	1,82E+05	1,82E+05
6	1,65E+05	1,68E+05	2,53E+05	2,60E+05	2,07E+05	2,17E+05	2,47E+05	2,45E+05
9	1,65E+05	1,75E+05	1,79E+05	1,92E+05	1,97E+05	1,96E+05	1,48E+05	1,52E+05
12	2,69E+05	2,85E+05	1,62E+05	1,72E+05	1,17E+05	1,24E+05	2,91E+05	2,83E+05
15	1,41E+05	1,37E+05	1,00E+05	1,03E+05	1,35E+05	1,42E+05	2,46E+05	2,46E+05
18	1,57E+05	1,56E+05	1,80E+05	1,83E+05	1,63E+05	1,62E+05	2,52E+05	2,47E+05
21	1,22E+05	1,27E+05	1,49E+05	1,54E+05	1,23E+05	1,19E+05	2,09E+05	1,96E+05

Drd4 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,70E+07	2,73E+07	3,50E+07	3,55E+07	3,59E+07	3,69E+07	2,81E+07	2,78E+07
3	2,54E+07	2,69E+07	2,01E+07	2,13E+07	1,92E+07	1,99E+07	1,89E+07	1,89E+07
6	1,66E+07	1,63E+07	1,39E+07	1,41E+07	1,71E+07	1,68E+07	1,76E+07	1,73E+07
9	1,62E+07	1,60E+07	1,81E+07	1,76E+07	1,45E+07	1,49E+07	1,46E+07	1,52E+07
12	1,18E+07	1,26E+07	9,93E+06	9,57E+06	1,34E+07	1,45E+07	9,64E+06	9,60E+06
15	2,65E+07	2,94E+07	2,77E+07	3,03E+07	2,93E+07	3,18E+07	2,19E+07	2,56E+07
18	3,41E+07	3,24E+07	3,58E+07	3,73E+07	4,28E+07	4,15E+07	3,52E+07	3,76E+07
21	2,68E+07	2,70E+07	2,71E+07	2,88E+07	3,49E+07	3,58E+07	3,00E+07	3,20E+07

Drd4 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,55E+07	2,79E+07	3,41E+07	3,30E+07	3,22E+07	3,42E+07	3,19E+07	3,13E+07
3	2,25E+07	2,38E+07	2,06E+07	2,12E+07	1,70E+07	1,90E+07	1,68E+07	1,66E+07
6	1,50E+07	1,52E+07	1,72E+07	1,59E+07	1,63E+07	1,74E+07	1,63E+07	1,42E+07
9	1,68E+07	1,94E+07	1,80E+07	1,81E+07	1,61E+07	1,80E+07	1,12E+07	1,19E+07
12	2,05E+07	2,05E+07	1,81E+07	1,86E+07	1,51E+07	1,52E+07	1,40E+07	1,42E+07
15	2,94E+07	2,96E+07	2,79E+07	3,02E+07	2,93E+07	3,14E+07	2,34E+07	2,40E+07
18	3,99E+07	3,95E+07	3,71E+07	3,81E+07	4,70E+07	4,68E+07	2,42E+07	2,25E+07
21	3,62E+07	3,53E+06	3,71E+07	3,55E+07	3,74E+07	3,50E+07	1,51E+07	1,88E+07

E4bp4 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,04E+03	1,16E+03	1,17E+03	1,21E+03	1,27E+03	1,34E+03	8,82E+02	8,97E+02
3	9,85E+02	1,07E+03	9,88E+02	1,08E+03	1,18E+03	1,22E+03	1,10E+03	1,09E+03
6	1,20E+03	1,19E+03	8,66E+02	9,40E+02	1,15E+03	1,23E+03	1,39E+03	1,37E+03
9	1,08E+03	1,09E+03	1,04E+03	1,12E+03	8,41E+02	8,05E+02	9,06E+02	8,51E+02
12	1,13E+03	1,11E+03	4,26E+02	4,71E+02	9,51E+02	9,99E+02	3,43E+02	3,29E+02
15	1,25E+03	1,32E+03	1,33E+03	1,40E+03	1,35E+03	1,46E+03	1,06E+03	1,14E+03
18	1,24E+03	1,24E+03	1,25E+03	1,30E+03	1,77E+03	1,71E+03	1,44E+03	1,43E+03
21	8,76E+02	8,89E+02	9,13E+02	9,51E+02	1,27E+03	1,27E+03	1,20E+03	1,25E+03

E4bp4 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	8,79E+02	8,98E+02	1,24E+03	1,25E+03	1,25E+03	1,21E+03	1,27E+03	1,29E+03
3	1,09E+03	1,19E+03	1,11E+03	1,19E+03	9,55E+02	9,80E+02	1,14E+03	1,11E+03
6	1,12E+03	1,15E+03	1,39E+03	1,30E+03	1,13E+03	1,13E+03	1,38E+03	1,33E+03
9	1,24E+03	1,27E+03	1,18E+03	1,17E+03	1,06E+03	1,07E+03	8,02E+02	8,04E+02
12	1,52E+03	1,55E+03	1,21E+03	1,30E+03	9,10E+02	9,15E+02	1,40E+03	1,43E+03
15	1,43E+03	1,50E+03	1,24E+03	1,24E+03	1,21E+03	1,17E+03	1,45E+03	1,49E+03
18	1,34E+03	1,28E+03	1,36E+03	1,35E+03	1,45E+03	1,45E+03	1,40E+03	1,46E+03
21	1,19E+03	1,20E+03	1,12E+03	1,11E+03	1,05E+03	1,05E+03	1,16E+03	1,10E+03

Egr1 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	5,02E+02	5,24E+02	1,06E+03	1,11E+03	1,16E+03	1,17E+03	5,06E+02	4,67E+02
3	7,81E+02	8,09E+02	9,16E+02	9,95E+02	1,16E+03	1,20E+03	1,12E+03	1,18E+03
6	4,23E+02	4,05E+02	5,38E+02	5,45E+02	1,03E+03	9,98E+02	7,84E+02	7,17E+02
9	1,03E+03	1,10E+03	1,03E+03	1,02E+03	7,85E+02	7,59E+02	1,30E+03	1,31E+03
12	2,48E+03	2,39E+03	1,16E+03	1,17E+03	1,28E+03	1,31E+03	6,50E+02	6,94E+02
15	6,42E+03	6,81E+03	1,07E+04	1,15E+04	1,01E+04	1,09E+04	6,36E+03	7,21E+03
18	2,16E+03	2,26E+03	1,43E+03	1,50E+03	2,39E+03	2,30E+03	3,49E+03	3,68E+03
21	5,24E+02	5,44E+02	6,39E+02	5,88E+02	5,05E+02	4,63E+02	4,55E+02	4,66E+02

Egr1 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	4,28E+02	3,92E+02	5,07E+02	4,85E+02	7,79E+02	7,81E+02	4,45E+02	4,50E+02
3	1,50E+03	1,58E+03	8,01E+02	7,90E+02	7,59E+02	7,84E+02	9,74E+02	9,76E+02
6	3,88E+02	4,09E+02	9,99E+02	9,56E+02	6,97E+02	6,82E+02	1,08E+03	1,08E+03
9	9,39E+02	8,93E+02	1,09E+03	1,03E+03	1,11E+03	1,10E+03	5,39E+02	5,00E+02
12	8,83E+03	8,17E+03	1,73E+03	1,71E+03	7,09E+02	6,99E+02	4,29E+03	4,25E+03
15	1,58E+04	1,62E+04	1,09E+04	1,15E+04	9,93E+03	9,44E+03	2,53E+04	2,61E+04
18	5,97E+03	5,76E+03	6,04E+03	6,45E+03	7,35E+03	7,31E+03	8,65E+03	9,13E+03
21	1,50E+03	1,49E+03	3,01E+03	3,02E+03	8,49E+02	8,73E+02	1,97E+03	1,91E+03

Gnaz 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,07E+04	2,14E+04	2,91E+04	2,96E+04	2,50E+04	2,53E+04	2,01E+04	2,00E+04
3	2,13E+04	2,21E+04	2,16E+04	2,21E+04	2,07E+04	2,12E+04	2,07E+04	2,18E+04
6	2,19E+04	2,16E+04	1,84E+04	1,91E+04	2,46E+04	2,40E+04	2,78E+04	2,74E+04
9	2,03E+04	2,02E+04	2,51E+04	2,47E+04	1,86E+04	1,89E+04	2,10E+04	2,18E+04
12	2,00E+04	2,09E+04	7,15E+03	7,05E+03	1,79E+04	1,72E+04	6,55E+03	6,55E+03
15	2,93E+04	3,18E+04	3,54E+04	3,72E+04	2,97E+04	3,27E+04	2,45E+04	2,71E+04
18	2,57E+04	2,60E+04	3,20E+04	3,27E+04	6,43E+04	6,16E+04	3,48E+04	3,65E+04
21	2,70E+04	2,88E+04	2,41E+04	2,46E+04	6,33E+04	6,29E+04	3,26E+04	3,59E+04

Gnaz 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,15E+04	1,17E+04	1,81E+04	1,90E+04	2,23E+04	2,33E+04	2,74E+04	2,73E+04
3	2,05E+04	2,12E+04	1,88E+04	2,12E+04	1,79E+04	1,92E+04	2,19E+04	2,19E+04
6	1,39E+04	1,42E+04	2,30E+04	2,05E+04	1,89E+04	1,94E+04	2,54E+04	2,34E+04
9	1,72E+04	1,80E+04	2,12E+04	2,23E+04	1,97E+04	2,11E+04	1,90E+04	1,91E+04
12	2,49E+04	2,55E+04	1,52E+04	1,47E+04	1,23E+04	1,20E+04	2,27E+04	2,44E+04
15	2,03E+04	2,09E+04	2,10E+04	2,20E+04	2,69E+04	2,56E+04	4,08E+04	3,98E+04
18	2,86E+04	2,79E+04	3,22E+04	3,01E+04	3,47E+04	3,40E+04	3,83E+04	3,84E+04
21	2,16E+04	2,11E+04	2,55E+04	3,60E+04	2,60E+04	2,47E+04	3,22E+04	3,50E+04

Gapdh 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	8,88E+05	8,58E+05	8,52E+05	8,51E+05	8,94E+05	9,20E+05	6,39E+05	6,69E+05
3	8,93E+05	9,04E+05	9,29E+05	9,33E+05	9,20E+05	9,26E+05	8,82E+05	9,30E+05
6	8,65E+05	8,59E+05	7,29E+05	7,50E+05	9,41E+05	9,29E+05	1,08E+06	1,14E+06
9	8,51E+05	8,34E+05	9,23E+05	9,36E+05	7,52E+05	7,60E+05	8,31E+05	8,69E+05
12	8,18E+05	8,90E+05	4,84E+05	5,03E+05	6,27E+05	6,58E+05	4,58E+05	4,60E+05
15	8,20E+05	8,50E+05	9,86E+05	1,05E+06	9,03E+05	9,49E+05	7,85E+05	8,51E+05
18	8,11E+05	8,10E+05	7,81E+05	9,39E+05	1,16E+06	1,09E+06	9,12E+05	9,76E+05
21	7,34E+05	7,29E+05	7,10E+05	7,56E+05	9,11E+05	8,98E+05	7,81E+05	8,42E+05

Gapdh 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	6,54E+05	7,31E+05	1,11E+06	1,09E+06	8,53E+05	9,41E+05	1,01E+06	1,06E+06
3	1,05E+06	1,09E+06	1,02E+06	1,10E+06	8,66E+05	9,17E+05	1,06E+06	1,12E+06
6	8,82E+05	9,23E+05	1,07E+06	9,74E+05	8,13E+05	8,42E+05	1,11E+06	1,01E+06
9	1,07E+06	1,11E+06	9,84E+05	1,02E+06	8,92E+05	9,34E+05	7,34E+05	7,75E+05
12	1,09E+06	1,10E+06	9,29E+05	9,70E+05	6,37E+05	6,65E+05	1,04E+06	1,09E+06
15	1,09E+06	1,18E+06	8,70E+05	9,63E+05	7,48E+05	8,09E+05	1,02E+06	1,09E+06
18	8,72E+05	9,82E+05	1,06E+06	1,07E+06	9,75E+05	1,02E+06	1,04E+06	1,06E+06
21	9,09E+05	8,74E+05	1,01E+06	1,06E+06	8,21E+05	7,35E+05	9,46E+05	1,04E+06

Npas 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,71E+02	1,87E+02	3,19E+02	3,04E+02	1,67E+02	1,55E+02	1,46E+02	1,64E+02
3	1,87E+02	2,05E+02	2,71E+02	2,76E+02	1,62E+02	1,84E+02	2,29E+02	2,17E+02
6	1,69E+02	1,96E+02	1,91E+02	1,73E+02	2,11E+02	2,72E+02	3,38E+02	3,45E+02
9	1,75E+02	1,66E+02	2,81E+02	2,66E+02	1,46E+02	1,54E+02	1,99E+02	1,85E+02
12	2,09E+02	2,05E+02	7,58E+01	8,04E+01	1,71E+02	1,53E+02	8,48E+01	6,92E+01
15	1,54E+02	1,89E+02	2,10E+02	2,11E+02	1,54E+02	1,52E+02	1,36E+02	1,64E+02
18	1,87E+02	1,55E+02	2,54E+02	2,44E+02	3,20E+02	3,04E+02	2,45E+02	2,61E+02
21	1,38E+02	1,55E+02	1,82E+02	1,93E+02	2,34E+02	2,52E+02	1,98E+02	2,16E+02

Npas 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,53E+02	1,58E+02	1,55E+02	1,61E+02	2,53E+02	2,18E+02	2,47E+02	2,21E+02
3	2,19E+02	2,38E+02	2,02E+02	1,76E+02	1,68E+02	1,72E+02	2,11E+02	1,73E+02
6	1,75E+02	1,72E+02	2,41E+02	2,38E+02	1,87E+02	2,22E+02	2,42E+02	2,73E+02
9	1,94E+02	1,82E+02	1,63E+02	1,54E+02	1,69E+02	1,85E+02	1,61E+02	1,44E+02
12	3,03E+02	2,73E+02	1,35E+02	1,45E+02	1,43E+02	1,27E+02	2,45E+02	2,28E+02
15	1,97E+02	1,70E+02	1,17E+02	1,14E+02	1,77E+02	1,42E+02	2,40E+02	2,29E+02
18	2,19E+02	2,21E+02	1,89E+02	1,80E+02	1,98E+02	2,10E+02	2,74E+02	2,78E+02
21	1,83E+02	2,23E+02	1,42E+02	9,11E+01	1,68E+02	1,61E+02	2,18E+02	2,33E+02

Nr1d1 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	5,08E+04	5,26E+04	7,62E+04	8,46E+04	3,72E+04	3,97E+04	2,60E+04	2,75E+04
3	5,22E+04	5,58E+04	7,01E+04	7,19E+04	6,62E+04	6,87E+04	6,37E+04	6,45E+04
6	5,62E+04	5,63E+04	5,69E+04	5,68E+04	9,04E+04	8,99E+04	1,38E+04	1,36E+04
9	5,87E+04	5,86E+04	9,09E+04	9,80E+04	4,29E+04	4,41E+04	6,98E+04	7,09E+04
12	8,18E+04	8,45E+04	1,56E+04	1,64E+04	3,89E+04	3,85E+04	6,31E+03	6,71E+03
15	3,71E+04	4,07E+04	6,97E+04	6,93E+04	5,20E+04	5,54E+04	3,82E+04	4,09E+04
18	2,92E+04	3,27E+04	5,82E+04	6,54E+04	8,18E+04	8,36E+04	6,58E+04	6,71E+04
21	2,47E+04	2,50E+04	4,36E+04	4,28E+04	4,68E+04	4,50E+04	6,02E+04	6,00E+04

Nr1d1 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,86E+04	2,69E+04	4,15E+04	4,12E+04	5,64E+04	5,73E+04	6,70E+04	6,85E+04
3	7,01E+04	7,42E+04	4,82E+04	5,08E+04	4,51E+04	4,82E+04	6,25E+04	6,27E+04
6	4,38E+04	4,73E+04	8,48E+04	8,44E+04	6,28E+04	6,74E+04	9,12E+04	8,62E+04
9	4,50E+04	4,39E+04	5,85E+04	5,86E+04	6,39E+04	6,29E+04	4,49E+04	4,42E+04
12	9,98E+04	9,91E+04	4,04E+04	4,14E+04	2,39E+04	2,28E+04	8,91E+04	8,83E+04
15	3,67E+04	3,96E+04	2,75E+04	2,71E+04	3,38E+04	3,41E+04	8,21E+04	8,20E+04
18	4,37E+04	4,10E+04	6,47E+04	5,91E+04	4,71E+04	4,42E+04	8,44E+04	8,34E+04
21	3,54E+04	3,40E+04	5,30E+04	5,09E+04	3,26E+04	3,39E+04	7,11E+04	6,97E+04

Nr2e3 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,74E+05	2,84E+05	2,94E+05	2,93E+05	2,93E+05	2,88E+05	2,45E+05	2,49E+05
3	2,53E+05	2,78E+05	2,63E+05	2,79E+05	3,09E+05	3,34E+05	2,95E+05	3,15E+05
6	2,85E+05	2,94E+05	2,31E+05	2,38E+05	2,95E+05	3,05E+05	3,01E+05	2,86E+05
9	2,30E+05	2,33E+05	2,29E+05	2,37E+05	2,09E+05	2,22E+05	2,24E+05	2,16E+05
12	2,34E+05	2,45E+05	1,01E+05	1,12E+05	2,50E+05	2,57E+05	1,14E+05	1,14E+05
15	1,62E+05	1,72E+05	1,44E+05	1,57E+05	1,71E+05	1,80E+05	1,52E+05	1,58E+05
18	1,93E+05	1,99E+05	1,92E+05	1,99E+05	2,76E+05	2,75E+05	2,52E+05	2,50E+05
21	1,91E+05	1,91E+05	2,09E+05	2,18E+05	3,02E+05	3,05E+05	2,61E+05	2,66E+05

Nr2e3 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,89E+05	1,92E+05	3,14E+05	3,14E+05	3,54E+05	3,58E+05	4,07E+05	4,00E+05
3	2,93E+05	3,09E+05	3,59E+05	3,59E+05	3,73E+05	3,50E+05	3,66E+05	3,85E+05
6	2,22E+05	2,34E+05	3,15E+05	3,15E+05	2,98E+05	3,07E+05	3,36E+05	3,49E+05
9	2,85E+05	2,61E+05	2,59E+05	2,59E+05	2,71E+05	2,77E+05	2,71E+05	2,60E+05
12	3,22E+05	3,18E+05	2,52E+05	2,52E+05	2,32E+05	2,33E+05	2,96E+05	2,99E+05
15	1,69E+05	1,72E+05	1,31E+05	1,31E+05	1,78E+05	1,73E+05	1,76E+05	1,76E+05
18	1,92E+05	1,88E+05	1,90E+05	1,90E+05	2,77E+05	2,77E+05	2,37E+05	2,43E+05
21	2,35E+05	2,16E+05	2,35E+05	2,35E+05	2,96E+05	2,89E+05	2,33E+05	2,23E+05

Nr4a1 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,91E+03	2,86E+03	3,64E+03	3,76E+03	3,26E+03	3,35E+03	1,67E+03	1,72E+03
3	2,54E+03	2,96E+03	2,92E+03	3,09E+03	3,05E+03	3,16E+03	2,52E+03	2,88E+03
6	3,11E+03	3,03E+03	2,32E+03	2,23E+03	3,43E+03	3,47E+03	3,88E+03	4,04E+03
9	3,92E+03	3,77E+03	3,96E+03	4,17E+03	2,75E+03	2,84E+03	3,64E+03	3,88E+03
12	5,32E+03	5,32E+03	1,93E+03	2,03E+03	3,41E+03	3,52E+03	8,45E+02	9,18E+02
15	1,06E+04	1,10E+04	1,40E+04	1,53E+04	1,01E+04	1,10E+04	7,93E+03	8,63E+03
18	7,23E+03	7,61E+03	8,79E+03	9,43E+03	1,21E+04	1,22E+04	9,30E+03	9,48E+03
21	3,05E+03	2,92E+03	3,51E+03	3,56E+03	3,57E+03	3,53E+03	4,07E+03	4,11E+03

Nr4a1 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,53E+03	2,61E+03	2,81E+03	2,79E+03	2,55E+03	2,52E+03	2,97E+03	3,12E+03
3	3,65E+03	3,85E+03	2,94E+03	2,99E+03	1,75E+03	1,94E+03	2,06E+03	2,28E+03
6	1,96E+03	1,89E+03	3,21E+03	3,41E+03	2,12E+03	2,17E+03	3,35E+03	3,37E+03
9	2,91E+03	2,93E+03	3,55E+03	3,62E+03	2,97E+03	2,92E+03	1,92E+03	1,94E+03
12	5,61E+03	6,22E+03	3,61E+03	3,59E+03	1,69E+03	1,69E+03	5,31E+03	5,40E+03
15	9,18E+03	9,18E+03	1,21E+04	1,27E+04	1,21E+04	1,22E+04	2,08E+04	2,48E+04
18	1,04E+04	1,02E+04	1,37E+04	1,37E+04	1,24E+04	1,25E+04	1,31E+04	1,34E+04
21	4,58E+03	4,36E+03	7,31E+03	7,30E+03	3,72E+03	3,45E+03	7,60E+03	7,08E+03

Per1 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	5,25E+03	5,29E+03	1,17E+04	1,22E+04	7,95E+03	7,71E+03	4,54E+03	4,45E+03
3	9,53E+03	1,07E+04	1,55E+04	1,69E+04	1,81E+04	1,66E+04	1,60E+04	1,66E+04
6	9,17E+03	8,94E+03	9,96E+03	1,00E+04	2,15E+04	2,14E+04	3,97E+04	3,78E+04
9	1,48E+04	1,55E+04	1,80E+04	1,77E+04	1,31E+04	1,35E+04	2,52E+04	2,46E+04
12	2,26E+04	2,23E+04	5,90E+03	6,13E+03	1,29E+04	1,31E+04	3,47E+03	3,48E+03
15	7,27E+03	7,95E+03	1,60E+04	1,73E+04	1,15E+04	1,26E+04	1,28E+04	1,35E+04
18	5,90E+03	6,16E+03	6,44E+03	6,29E+03	1,47E+04	1,55E+04	1,58E+04	1,55E+04
21	4,14E+03	4,36E+03	6,44E+03	6,49E+03	8,55E+03	9,00E+03	1,43E+04	1,43E+04

Per1 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	6,18E+03	6,11E+03	8,24E+03	8,44E+03	1,50E+04	1,48E+04	1,80E+04	1,87E+04
3	1,76E+04	1,85E+04	1,42E+04	1,45E+04	1,15E+04	1,12E+04	1,62E+04	1,64E+04
6	1,23E+04	1,23E+04	2,36E+04	2,39E+04	2,02E+04	2,02E+04	2,41E+04	2,49E+04
9	1,25E+04	1,13E+04	1,56E+04	1,52E+04	2,06E+04	2,07E+04	1,52E+04	1,44E+04
12	2,24E+04	2,22E+04	1,16E+04	1,19E+04	7,55E+03	7,60E+03	2,74E+04	2,82E+04
15	9,99E+03	1,05E+04	7,70E+03	7,70E+03	1,24E+04	1,21E+04	3,23E+04	3,17E+04
18	9,70E+03	9,75E+03	1,51E+04	1,49E+04	1,37E+04	1,25E+04	2,62E+04	2,70E+04
21	6,90E+03	6,49E+03	1,01E+04	1,01E+04	9,56E+03	9,54E+03	2,54E+04	2,47E+04

Per2 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,95E+02	2,69E+02	4,95E+02	5,41E+02	3,02E+02	3,16E+02	2,66E+02	2,63E+02
3	4,38E+02	4,83E+02	6,29E+02	6,40E+02	4,36E+02	4,78E+02	5,75E+02	5,78E+02
6	4,41E+02	4,28E+02	5,50E+02	5,15E+02	5,92E+02	5,82E+02	1,11E+03	1,14E+03
9	7,87E+02	8,42E+02	8,13E+02	8,53E+02	5,26E+02	5,30E+02	1,21E+03	1,14E+03
12	1,19E+03	1,28E+03	3,52E+02	3,42E+02	5,37E+02	5,27E+02	2,41E+02	2,52E+02
15	4,61E+02	5,54E+02	7,85E+02	7,60E+02	5,71E+02	5,88E+02	5,40E+02	5,66E+02
18	3,72E+02	4,03E+02	3,64E+02	4,00E+02	6,01E+02	5,62E+02	6,25E+02	6,79E+02
21	2,98E+02	3,20E+02	3,56E+02	4,09E+02	5,70E+02	5,60E+02	5,66E+02	5,60E+02

Per2 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	5,07E+02	4,69E+02	3,79E+02	4,05E+02	6,21E+02	6,16E+02	6,70E+02	7,45E+02
3	9,15E+02	9,44E+02	4,74E+02	5,80E+02	4,10E+02	4,31E+02	8,38E+02	7,70E+02
6	6,22E+02	6,11E+02	8,30E+02	8,00E+02	7,79E+02	8,21E+02	7,99E+02	7,82E+02
9	6,67E+02	6,16E+02	5,80E+02	5,11E+02	7,37E+02	7,50E+02	7,49E+02	6,85E+02
12	1,20E+03	1,13E+03	5,23E+02	5,77E+02	3,57E+02	3,68E+02	1,06E+03	1,04E+03
15	6,09E+02	6,20E+02	2,72E+02	2,90E+02	4,88E+02	4,66E+02	1,01E+03	9,92E+02
18	7,90E+02	7,26E+02	6,36E+02	6,66E+02	5,28E+02	5,03E+02	1,32E+03	1,15E+03
21	4,49E+02	4,52E+02	5,63E+02	6,31E+02	3,80E+02	4,22E+02	1,02E+03	9,77E+02

Per3 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,10E+03	2,01E+03	3,52E+03	3,63E+03	1,40E+05	1,49E+05	1,44E+05	1,49E+05
3	3,07E+03	3,32E+03	3,90E+03	4,20E+03	2,31E+05	2,37E+05	2,65E+05	2,79E+05
6	2,77E+03	2,67E+03	3,24E+03	3,38E+03	2,65E+05	2,74E+05	4,95E+05	5,20E+05
9	3,94E+03	4,01E+03	4,42E+03	4,60E+03	1,90E+05	1,82E+05	3,40E+05	3,64E+05
12	5,72E+03	5,09E+03	1,85E+03	1,91E+03	1,74E+05	1,89E+05	1,43E+05	1,41E+05
15	2,49E+03	2,64E+03	3,75E+03	3,97E+03	2,21E+05	2,35E+05	2,18E+05	2,31E+05
18	2,32E+03	2,40E+03	1,84E+03	1,94E+03	2,24E+05	2,30E+05	3,01E+05	3,03E+05
21	1,72E+03	1,68E+03	2,19E+03	2,27E+03	2,47E+05	2,40E+05	2,55E+05	2,67E+05

Per3 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	3,66E+03	3,64E+03	2,29E+03	2,35E+03	2,44E+05	2,37E+05	2,57E+05	2,68E+05
3	4,82E+03	5,03E+03	3,17E+03	3,01E+03	1,75E+05	1,85E+05	2,77E+05	2,96E+05
6	4,01E+03	4,12E+03	5,53E+03	5,00E+03	3,11E+05	3,17E+05	2,92E+05	2,93E+05
9	3,88E+03	3,91E+03	3,20E+03	3,10E+03	2,71E+05	2,78E+05	2,24E+05	2,11E+05
12	6,12E+03	6,09E+03	2,82E+03	2,70E+03	1,79E+05	1,72E+05	3,39E+05	3,33E+05
15	4,11E+03	4,38E+03	1,90E+03	1,93E+03	1,93E+05	1,81E+05	3,03E+05	3,17E+05
18	4,15E+03	3,78E+03	3,52E+03	3,56E+03	2,06E+05	2,10E+05	3,77E+05	3,92E+05
21	3,22E+03	2,98E+03	2,69E+03	2,59E+03	1,93E+05	1,87E+05	3,54E+05	3,17E+05

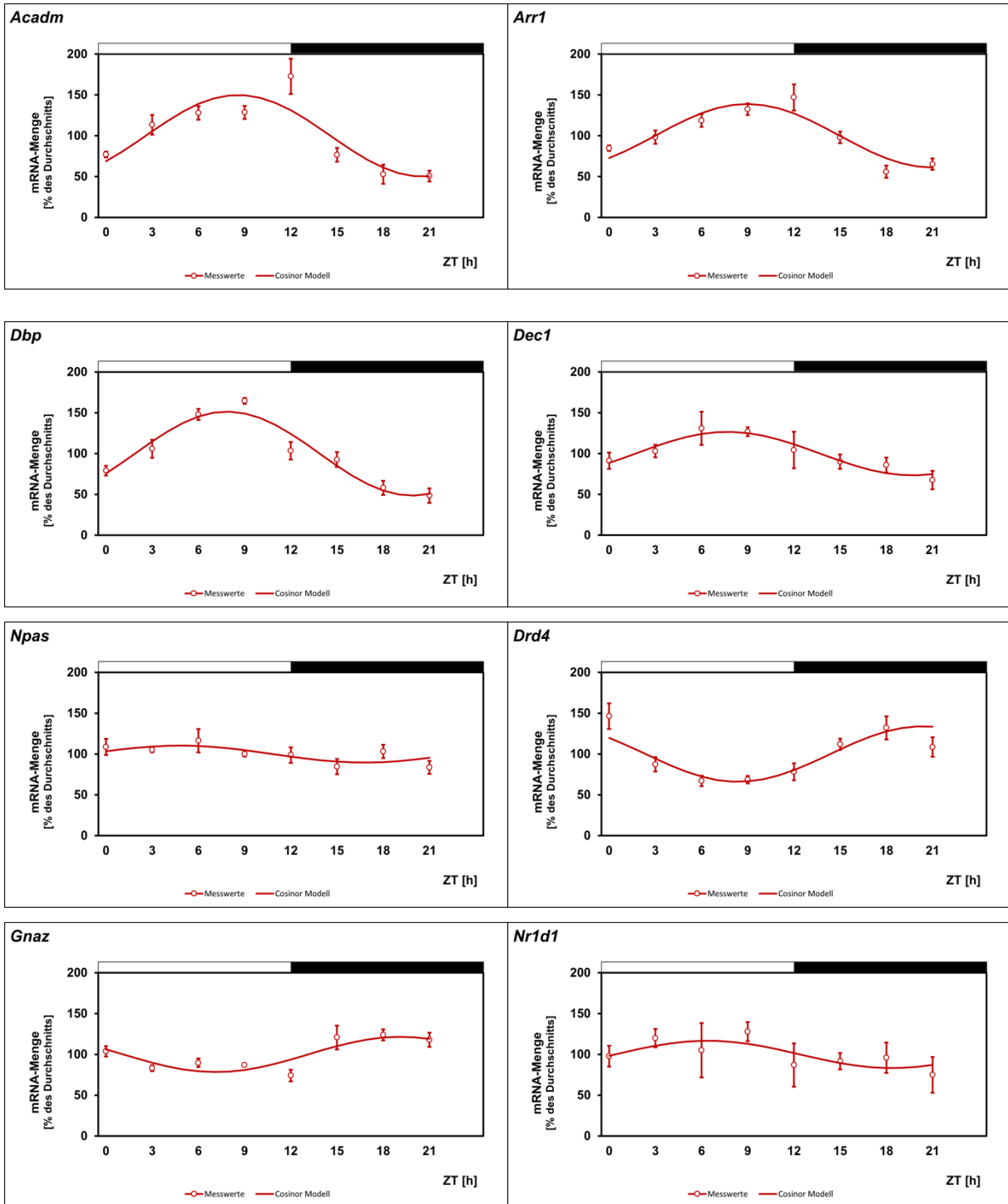
Rdh12 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,07E+05	9,70E+04	9,04E+04	9,49E+04	1,91E+05	1,69E+05	1,56E+05	1,71E+05
3	1,08E+05	1,31E+05	1,10E+05	1,24E+05	2,29E+05	2,35E+05	2,14E+05	2,24E+05
6	1,80E+05	1,59E+05	1,54E+05	1,44E+05	2,71E+05	2,66E+05	2,48E+05	2,71E+05
9	1,55E+05	1,71E+05	1,40E+05	1,51E+05	2,24E+05	2,27E+05	2,22E+05	2,39E+05
12	1,48E+05	1,69E+05	8,04E+04	9,14E+04	2,58E+05	2,57E+05	1,15E+05	1,27E+05
15	1,31E+05	1,65E+05	1,06E+05	1,33E+05	2,23E+05	2,38E+05	1,73E+05	1,86E+05
18	1,20E+05	1,19E+05	7,86E+04	9,21E+04	2,01E+05	1,97E+05	1,65E+05	1,85E+05
21	8,12E+04	7,49E+04	5,26E+04	6,21E+04	1,55E+05	1,40E+05	1,16E+05	1,33E+05

Rdh12 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	6,77E+04	6,41E+04	1,03E+05	1,35E+05	1,72E+05	1,64E+05	1,95E+05	2,01E+05
3	1,19E+05	1,22E+05	1,21E+05	1,32E+05	2,20E+05	2,33E+05	2,43E+05	2,50E+05
6	1,33E+05	1,76E+05	1,41E+05	1,36E+05	2,49E+05	2,79E+05	3,52E+05	3,34E+05
9	1,73E+05	1,68E+05	1,30E+05	1,27E+05	2,41E+05	2,42E+05	2,59E+05	2,57E+05
12	1,67E+05	1,58E+05	1,20E+05	1,30E+05	2,32E+05	2,26E+05	3,21E+05	2,74E+05
15	1,26E+05	1,34E+05	8,63E+04	8,75E+04	1,80E+05	1,35E+05	1,85E+05	2,03E+05
18	9,19E+04	8,84E+04	7,21E+04	7,71E+04	1,71E+05	1,60E+05	1,80E+05	2,04E+05
21	2,91E+04	6,69E+04	4,81E+04	3,64E+04	1,19E+05	1,07E+05	1,33E+05	1,37E+05

Rorß 70T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	2,06E+05	2,07E+05	3,18E+05	3,38E+05	1,89E+05	1,90E+05	1,37E+05	1,35E+05
3	1,93E+05	1,98E+05	2,71E+05	2,95E+05	1,97E+05	2,01E+05	2,06E+05	2,14E+05
6	2,67E+05	2,72E+05	2,35E+05	2,21E+05	2,90E+05	2,96E+05	3,46E+05	3,40E+05
9	2,31E+05	2,29E+05	3,16E+05	3,26E+05	2,13E+05	2,19E+05	2,37E+05	2,35E+05
12	2,89E+05	3,00E+05	9,74E+04	1,06E+05	1,85E+05	1,89E+05	6,39E+04	6,68E+04
15	2,40E+05	2,58E+05	3,42E+05	3,62E+05	2,43E+05	2,58E+05	1,90E+05	2,03E+05
18	2,63E+05	2,70E+05	3,66E+05	3,58E+05	4,02E+05	4,04E+05	2,91E+05	2,93E+05
21	2,15E+05	2,13E+05	2,53E+05	2,21E+05	2,81E+05	3,06E+05	2,71E+05	2,78E+05

Rorß 365T	Stamm 78-1 Konzentration		Stamm 78-2 Konzentration		Stamm 78-3 Konzentration		Stamm 78-4 Konzentration	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ZT								
0	1,63E+05	1,66E+05	2,25E+05	2,31E+05	2,26E+05	2,22E+05	2,91E+05	2,96E+05
3	2,31E+05	2,32E+05	1,78E+05	1,82E+05	1,29E+05	1,30E+05	2,06E+05	2,10E+05
6	1,39E+05	1,42E+05	2,51E+05	2,51E+05	1,93E+05	1,92E+05	2,32E+05	2,40E+05
9	1,76E+05	1,79E+05	2,20E+05	2,06E+05	2,08E+05	2,08E+05	2,22E+05	2,12E+05
12	3,51E+05	3,57E+05	2,04E+05	2,04E+05	1,31E+05	1,31E+05	2,90E+05	2,88E+05
15	2,12E+05	2,15E+05	1,65E+05	1,65E+05	2,01E+05	2,00E+05	3,57E+05	2,52E+05
18	3,42E+05	3,59E+05	4,10E+05	4,12E+05	2,36E+05	2,38E+05	4,44E+05	4,57E+05
21	2,05E+05	2,08E+05	3,58E+05	3,33E+05	1,97E+05	1,96E+05	4,01E+05	3,78E+05

8.2 Tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina junger Mäuse (70 Tage) unter LD 12:12 (Graphen)



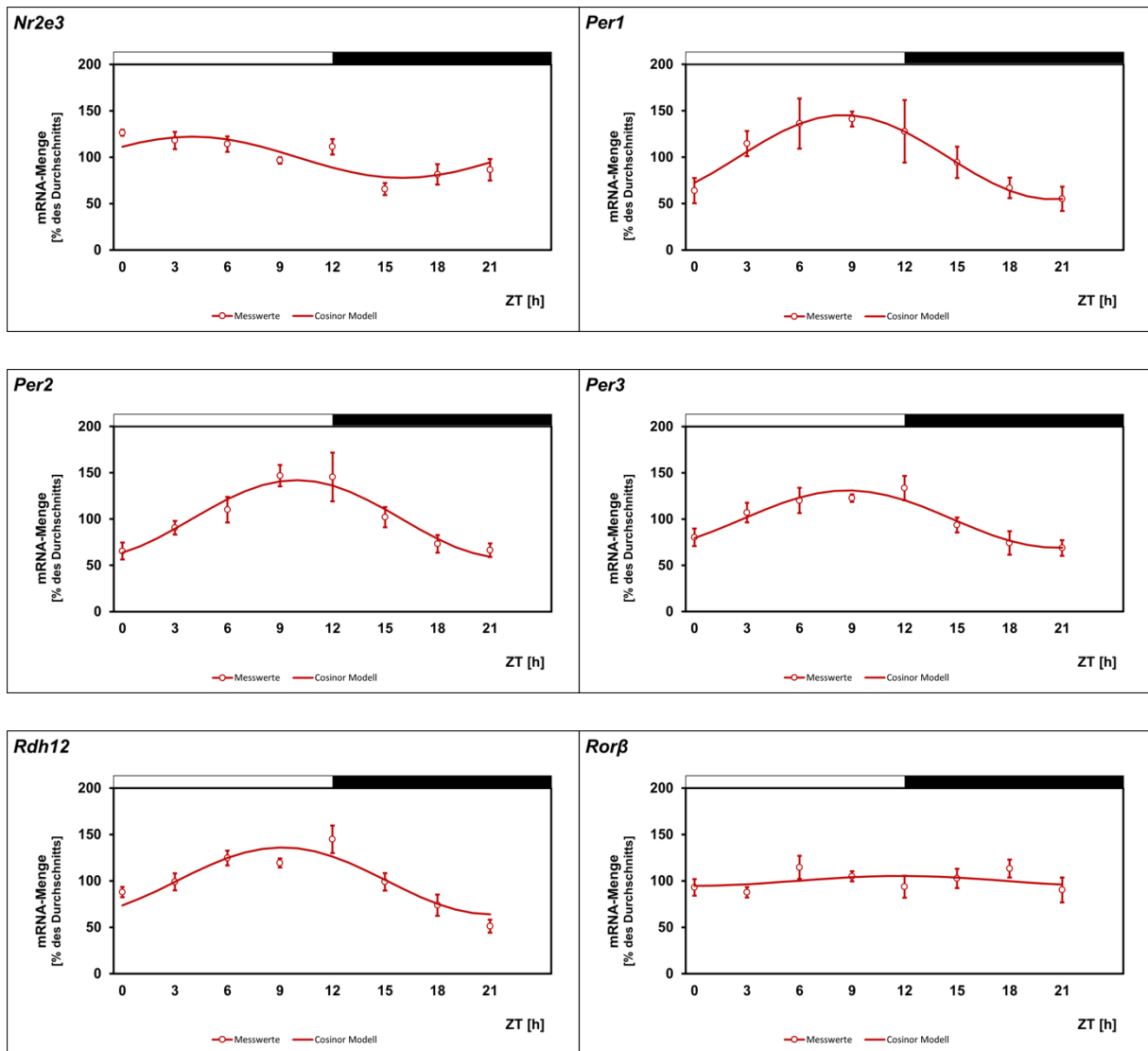
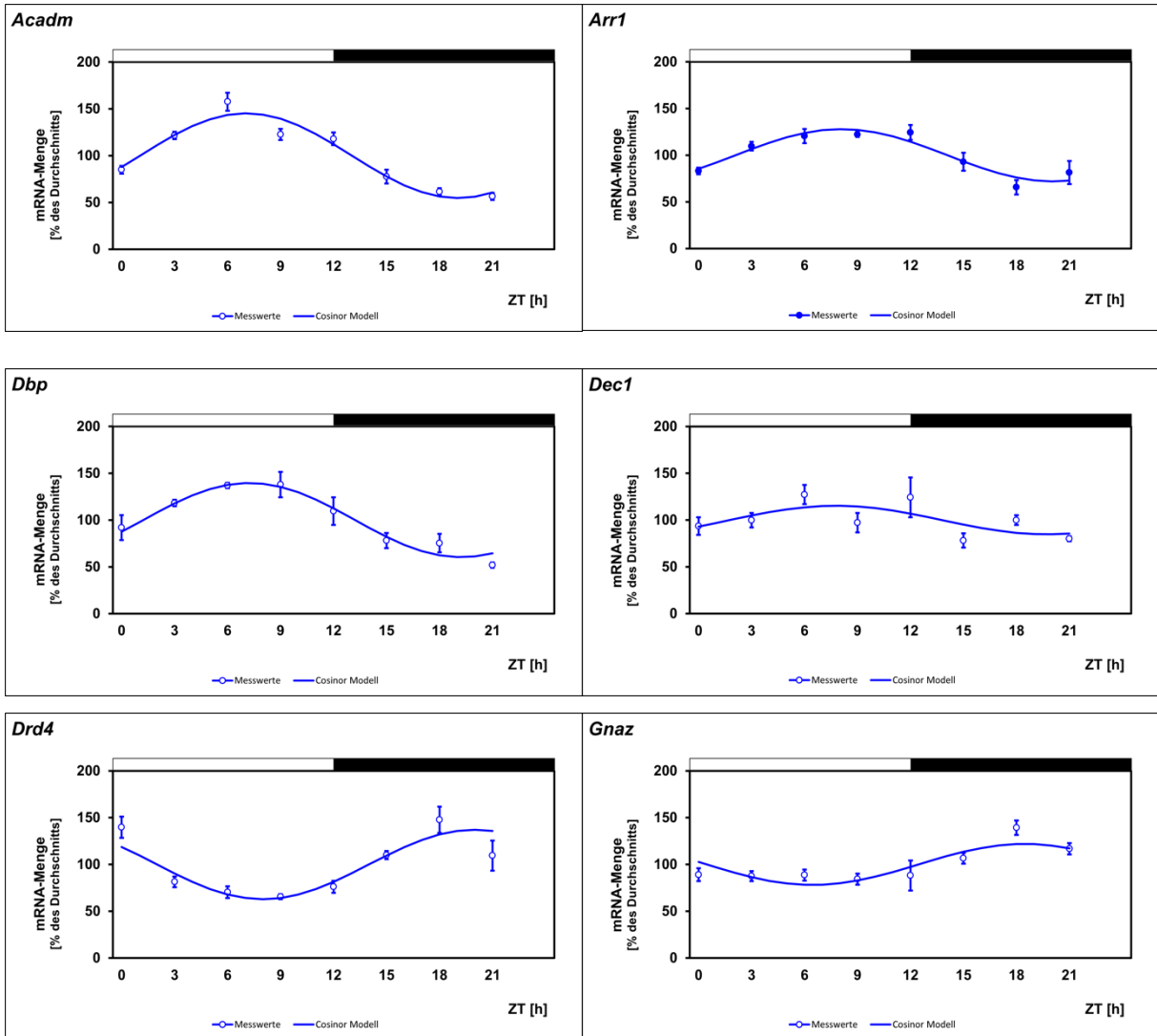


Abbildung 8: Weitere tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina junger Mäuse (70 Tage) unter LD 12:12

Es werden die übrigen, in Kapitel 4.1 nicht dargestellten tageszeitlichen Profile der mRNA-Menge der untersuchten Gene in der Retina alter Mäuse (365 Tage) (14 von 20) aufgeführt. Die mRNA-Menge wird als Funktion der Zeitgeber time (ZT) dargestellt. Die aus der Cosinor-Analyse errechnete sinusoidale Funktion wird als Linie dargestellt. Die ermittelten Daten wurden auf die Transkriptmenge der Haushaltsgene *Gapdh* und *18S* normiert und als Prozentpunkte aufgetragen (siehe Kapitel 3.2.6). Die statistische Analyse der tageszeitlichen Profile wird in Tabelle 7 dargestellt. Jeder Wert entspricht einem Mittelwert \pm SEM aus $n = 4$ Versuchen. In den Abbildungen markiert der helle Balken die Lichtphase, der dunkle Balken markiert die Dunkelphase.

8.3 Tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12 (Graphen)



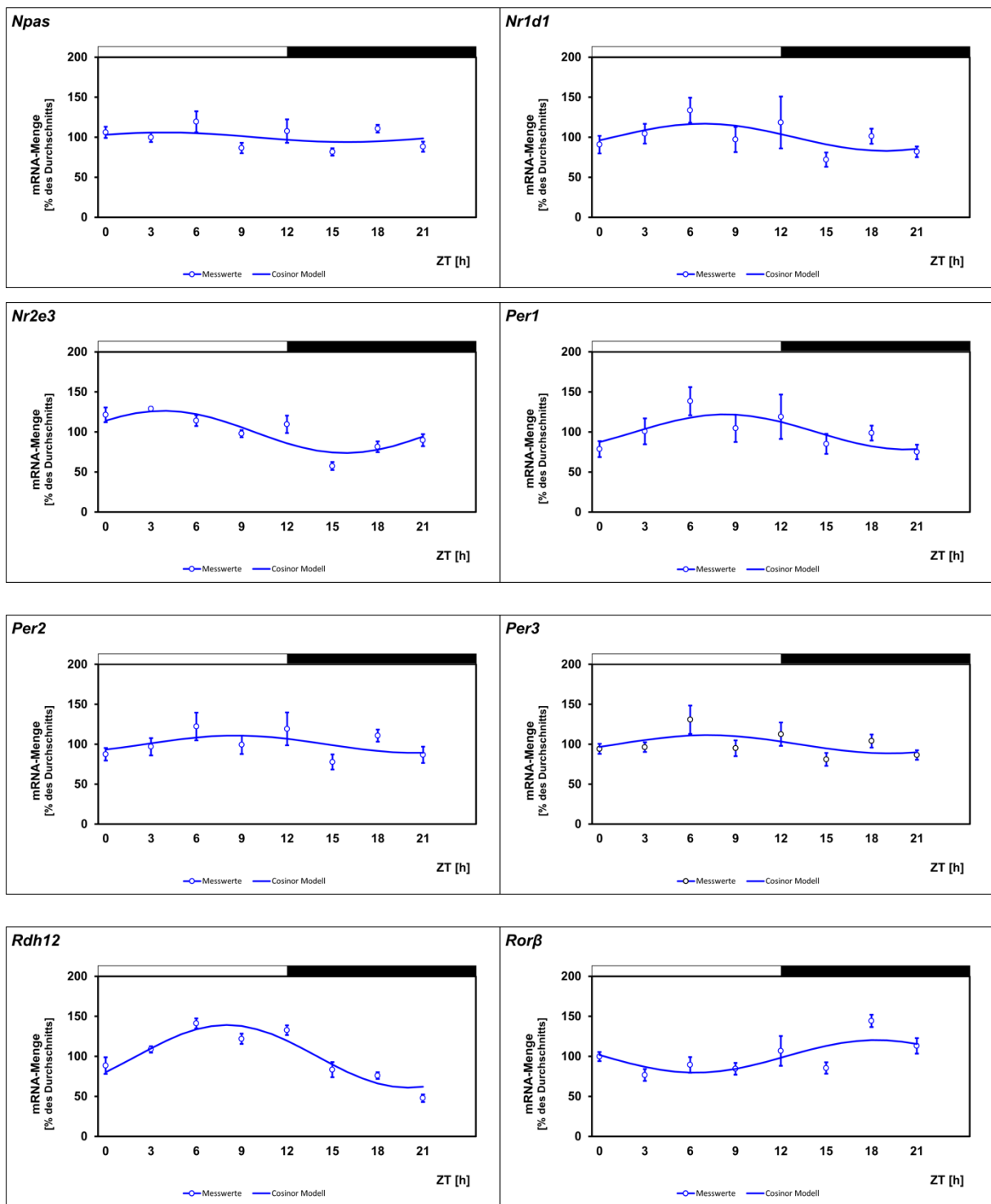
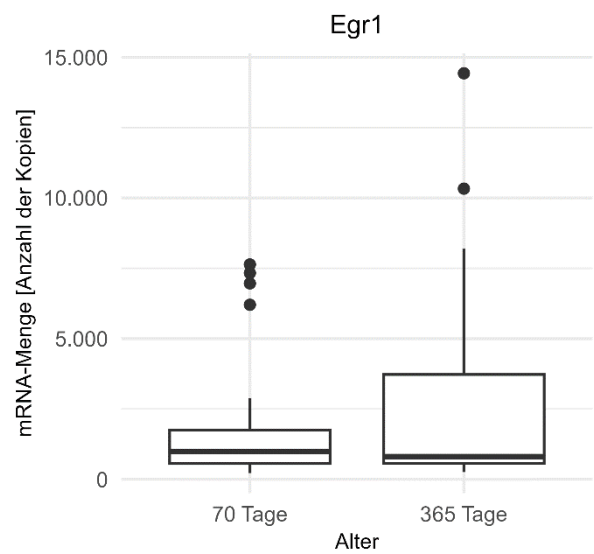
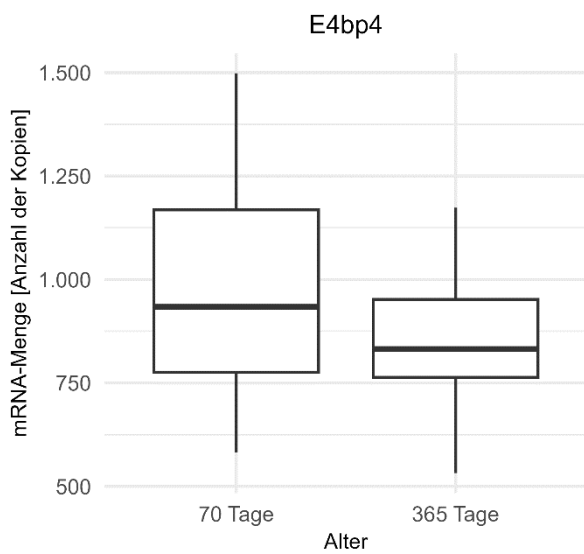
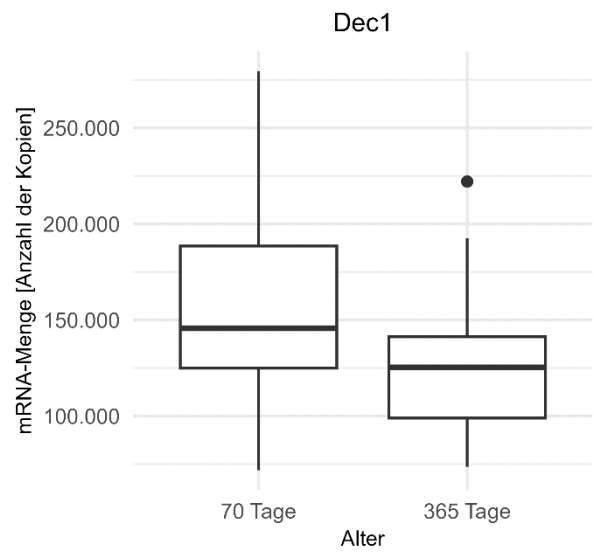
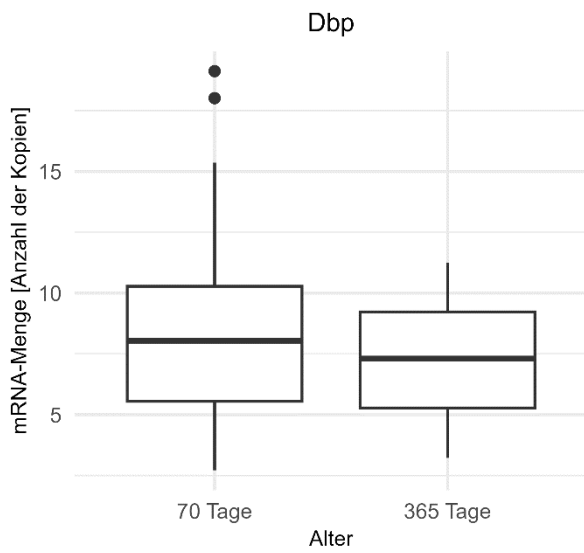
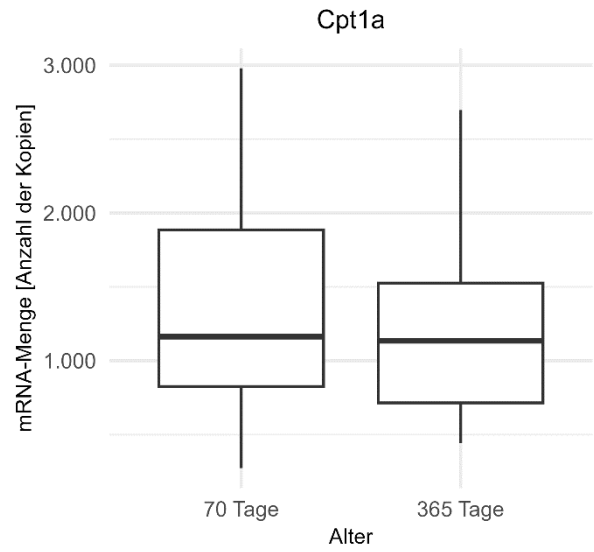
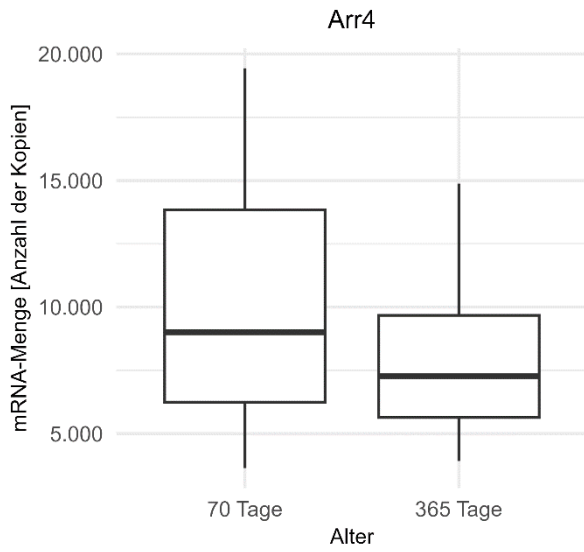
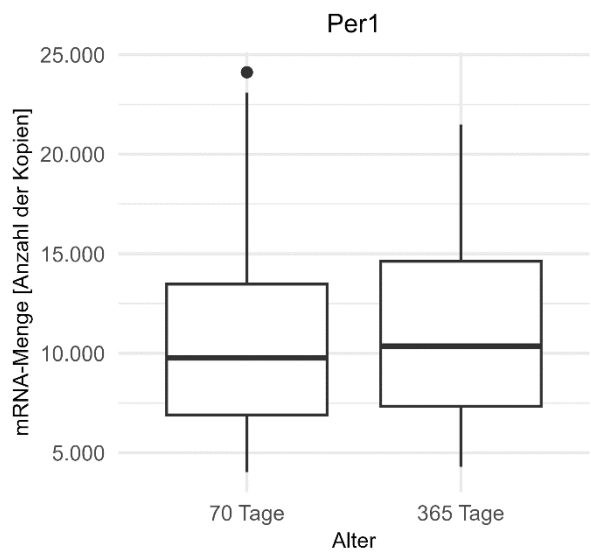
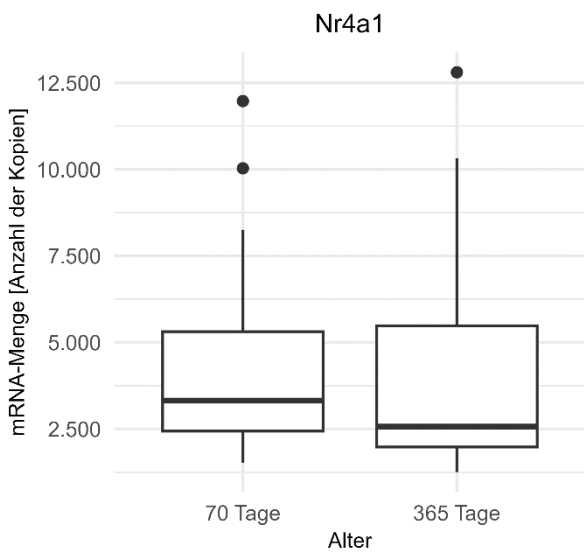
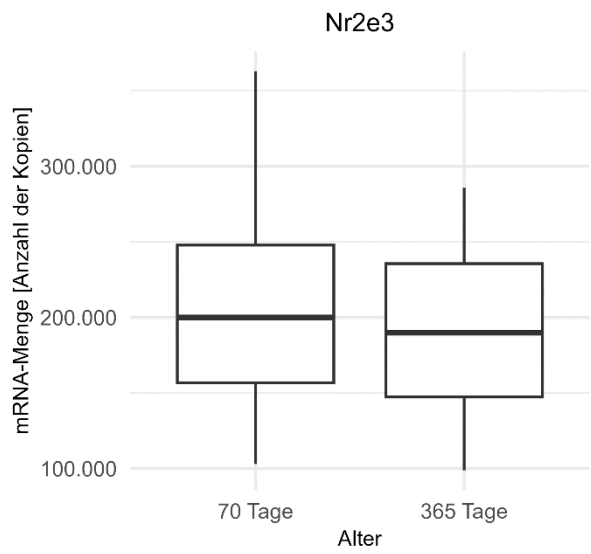
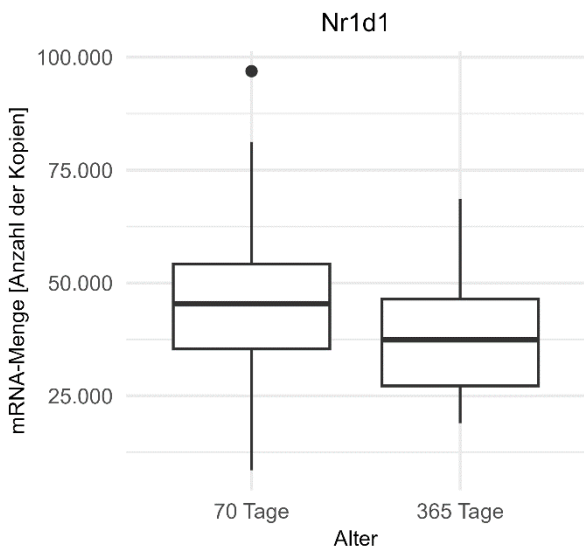
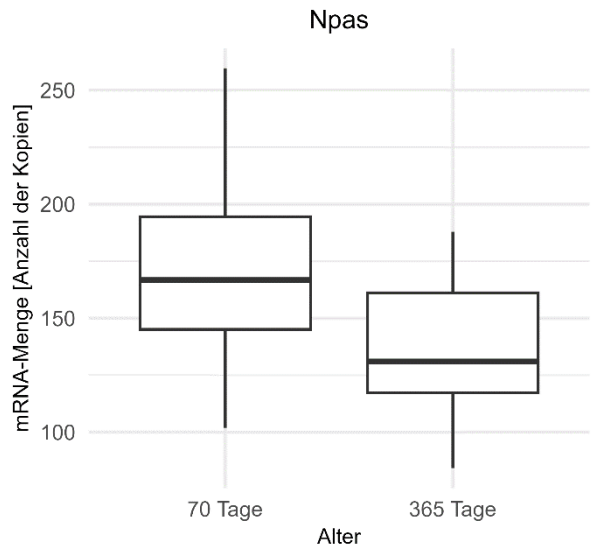
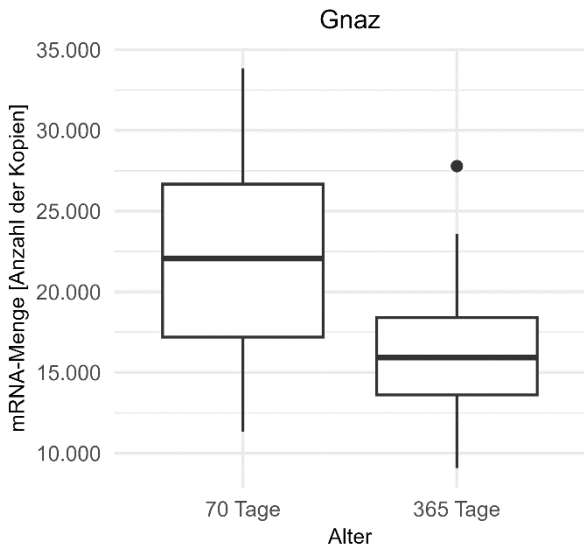


Abbildung 9: Weitere tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12

Es werden die übrigen, in Kapitel 4.2 nicht dargestellten tageszeitlichen Profile der mRNA-Menge der untersuchten Gene in der Retina alter Mäuse (365 Tage) (14 von 20) aufgeführt. Die mRNA-Menge wird als Funktion der Zeitgeber time (ZT) dargestellt. Die aus der Cosinor-Analyse errechnete sinusoidale Funktion wird als Linie dargestellt. Die Messwerte der Gene wurden mit dem Mittelwert der Transkriptmenge der Haushaltsgene *Gapdh* und *18S* normiert und als Prozentpunkte aufgetragen (siehe Kapitel 3.2.6). Die statistische Analyse der tageszeitlichen Profile wird in Tabelle 8 dargestellt. Jeder Wert entspricht einem Mittelwert \pm SEM aus $n = 4$ Versuchen. In den Abbildungen markiert der helle Balken die Lichtphase, der dunkle Balken markiert die Dunkelphase.

8.4 Durchschnittliche Genexpression in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12





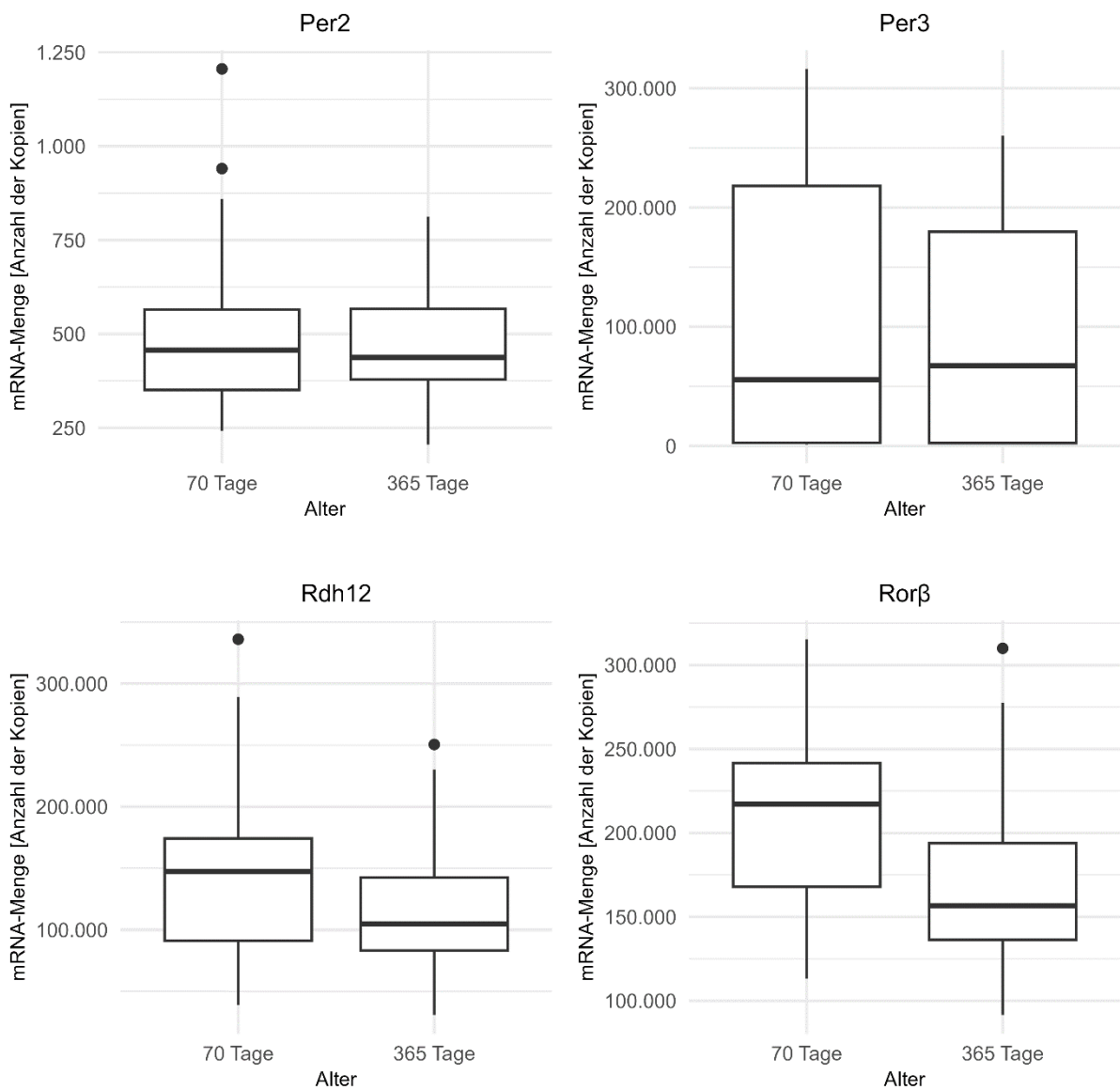
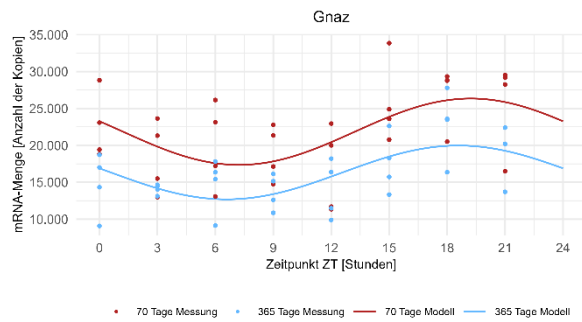
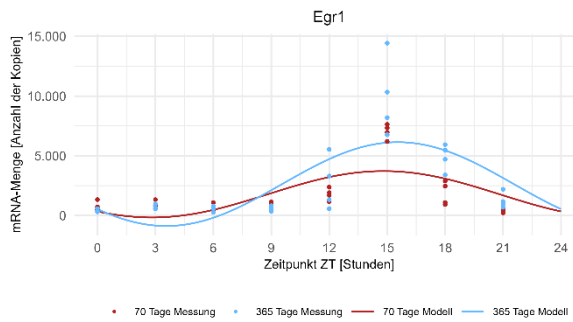
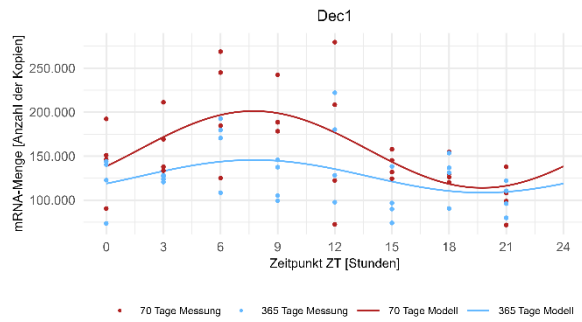
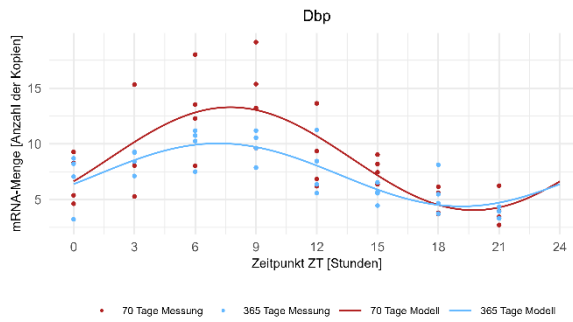
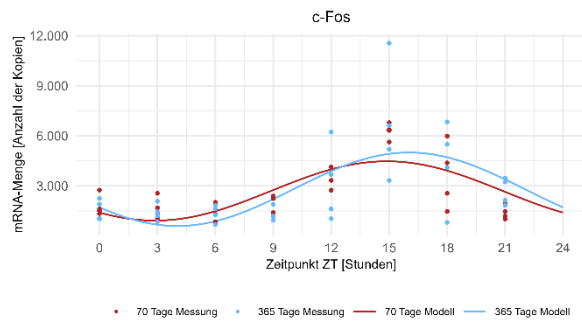
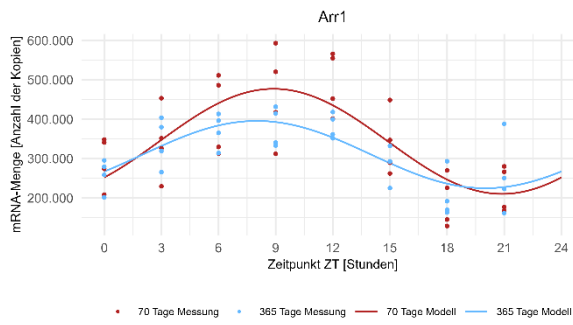


Abbildung 10: Weitere Graphen der durchschnittlichen Genexpression in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12

Es werden die übrigen, in Kapitel 4.3 nicht aufgeführten Graphen der durchschnittlichen Genexpression der untersuchten Gene (16 von 20) dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen der Genexpression wurde die Skalierung der Achsen für die bessere Lesbarkeit an die Gene angepasst. Die mRNA-Menge wird als Funktion des Alters (70 versus 365 Tage) dargestellt. Die ermittelten Daten wurden auf die Transkriptmenge der Haushaltsgene *Gapdh* und *18S* einfach normiert (siehe Formeln zu $N_i(t)$ aus Kapitel 3.2.6). Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen; die Linie in der Mitte der Box markiert den Median. Die Antennen stellen das maximal 1,5-Fache des Interquartilsabstands dar. Ausreißer werden als Punkte im Diagramm markiert. Die statistische Analyse der durchschnittlichen Genexpression wird in Tabelle 9 dargestellt.

8.5 Tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12



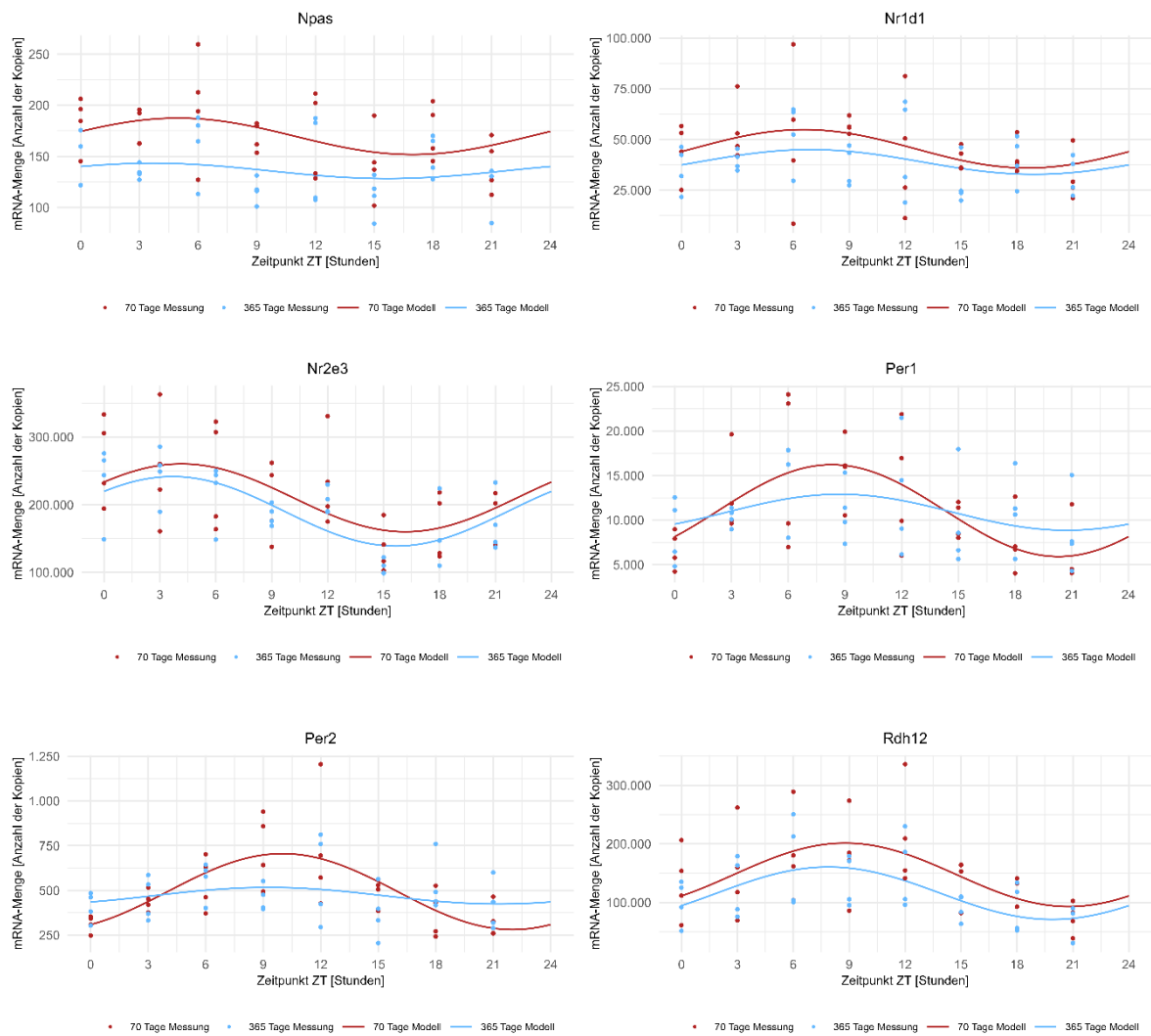


Abbildung 11: Weitere tageszeitliche Profile der mRNA-Menge in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD 12:12

Es werden die übrigen, in Kapitel 4.4 nicht dargestellten Graphen der tageszeitlichen Profile der mRNA-Menge in der Retina junger (70 Tage) und alter Mäuse (365 Tage) unter LD12:12 (12 von 20) aufgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen der Genexpression wurde die Skalierung der Achsen für die bessere Lesbarkeit an die Gene angepasst. Die mRNA-Menge wird als Funktion der Zeitgeber time (ZT) dargestellt. Die aus der Cosinor-Analyse errechnete sinusoidale Funktion wird als Linie dargestellt, die rote Linie stellt die sinusoidale Funktion für 70 Tage alte Mäuse und die blaue Linie für 365 Tage alte Mäuse dar. Die ermittelten Daten wurden auf die Transkriptmenge der Haushaltsgene *Gapdh* und *18S* normiert und als Prozent des Durchschnitts der Transkriptmenge der 24-stündigen Zeitperiode aufgetragen. Die statistische Analyse der tageszeitlichen Profile wird in Kapitel 4.4, Tabelle 10 dargestellt. Jeder Wert entspricht einem Mittelwert \pm SEM aus $n = 4$ Versuchen.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. et med. habil Rainer Spessert, der mir die Promotion in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Anatomie (ehemals Institut für Funktionelle und Klinische Anatomie) ermöglicht hat. Für die unbegrenzte, geduldige und herzliche Unterstützung, die Anleitung, die ständige Ansprechbarkeit und die Motivation bin ich sehr dankbar. Mit der Promotion habe ich dank der wunderbaren Betreuung die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten entdecken dürfen.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Spessert für die geduldige und nette Unterstützung im Laboralltag bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Kristina Schäfer für die herzliche und geduldige Anleitung im Labor, die Unterstützung bei der Auswertung, das Korrekturlesen und vor allem das immer offene Ohr bei Fragen und Problemen. Ferner möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Peter Mildemberger für die Unterstützung als Zweitgutachter danken.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Alicia Schulze aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik für die freundliche und geduldige Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Abschließend gilt mein Dank meinen Eltern, meinen Brüdern und meinen Großeltern sowie meinem Freund Jan für die bedingungslose Unterstützung, die vielen Ratschläge, das Korrekturlesen und den allgemeinen Beistand. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle meiner Großmutter aus Frankfurt danken, die mich immer wieder ermutigt hat, mir zur Seite stand, bedingungslos für mich da war und ein großes Vorbild ist.