### Rhythmen des Lebens Eine Einführung anhand ausgewählter Themen und Beispiele

Wolfgang Engelmann Institut für Botanik Physiologische Ökologie der Pflanzen Universität Tübingen Auf der Morgenstelle 1 D72076 Tübingen (Germany)

Tübingen, Dezember 2001

# Inhaltsverzeichnis

Fi	ür de	en Leser	3
Ei	infüh	urung in das Thema	5
Ü	bersi	icht über dieses Buch	9
1	τ	Ultradiane Rhythmen	13
	1.1	Chemische Oszillatoren	13
	1.2	Glykolyse-Oszillator	14
	1.3	Circumnutation bei Pflanzen	18
	1.4	Gravitropes Pendel	20
		1.4.1 Physiologie des Gravitropismus	20
		1.4.2 Messen der Bewegungen und Analyse	22
		1.4.3 Exogen oder endogen?	22
	1.5	Transpirationsrhythmen beim Hafer	22
	1.6	Seitenfiederbewegung des Automobile Desmodium	26
	1.7	REM-Schlaf der Säuger	32
	1.8	Ultradiane und circadiane Rhythmen	33
<b>2</b>	F	Rhythmen des Menschen	35
	2.1	Einführung	35
	2.2	Circadiane Rhythmen des Menschen	35
		2.2.1 Eigenschaften circadianer Rhythmen	38
		2.2.2 Warum sind circadiane Rhythmen für den Menschen wichtig?	39
	2.3	Schlaf-Wach Rhythmus des Menschen.	40
		2.3.1 Warum schlafen wir?	40
		2.3.2 Physiologie des Schlafes	41
		2.3.3 Circadiane Kontrolle des Schlafs	42
		2.3.4 Schlafstörungen and circadianer Rhythmus	43
		2.3.5 Modelle des Schlaf-Wach Zyklus	44
	2.4	Circadiane Kontrolle der Körpertemperatur	45
	2.5	Rhythmen im endokrinen System und bei der Reproduktion	50
	2.6	Monatsrhythmen beim Mensch	52
	2.7	Organisation des circadianen Systems des Menschen	54
	2.8	Modelle circadianer Rhythmen	54

	2.9 2.10 2.11 2.12	Chrone Schich Jetlag Medizi 2.12.1 2.12.2 2.12.3	obiologischer Phasentyp	56 56 61 67 68 69 70
3	Ţ	lhren v	on Nagern, ihre Zeiger und wie diese gestellt werden	73
Ŭ	3.1	Einfüh		73
	3.2	Synchi	ronisation des Oszillators durch Zeitgeber	75
	3.3	Beinfli	ussung des circadianen Systems. Alterseffekte	77
	3.4	Circad	jane Zentren	77
	3.5	Moleki	ulare Mechanismen der circadianen Oszillatoren	86
	3.6	Pineal	organ und Melatonin	86
	3.7	Bückk	opplungen und Maskierung	92
	3.8	Mutan	ten des circadianen Systems bei Nagern	92
	3.9	Andere	e circadiane Bhythmen	95
	3.10	Photo	periodismus bei Mäusen?	95
	3.11	Mus b	ooduga	95
	3.12	Offene	Fragen	96
4	C	Gonyaul	ax: Circadiane Rhythmen	97
	4.1	Tagesp	periodisches Leuchten	98
		4.1.1	Registrieranlage zum Messen der Biolumineszenz	98
		4.1.2	Blitzrhythmus und Glimmrhythmus	00
				99
		4.1.3	Präzision und Kommunikation	102
		$4.1.3 \\ 4.1.4$	Präzision und Kommunikation	99 102 102
		$\begin{array}{c} 4.1.3 \\ 4.1.4 \\ 4.1.5 \end{array}$	Präzision und Kommunikation	99 102 102 104
		$\begin{array}{c} 4.1.3 \\ 4.1.4 \\ 4.1.5 \\ 4.1.6 \\ \end{array}$	Präzision und Kommunikation	<ul> <li>99</li> <li>102</li> <li>102</li> <li>104</li> <li>107</li> </ul>
		4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7	Präzision und Kommunikation	<ul> <li>99</li> <li>102</li> <li>102</li> <li>104</li> <li>107</li> <li>111</li> </ul>
	4.2	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhythi	Präzision und Kommunikation	<ul> <li>99</li> <li>102</li> <li>102</li> <li>104</li> <li>107</li> <li>111</li> <li>111</li> </ul>
	4.2 4.3	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro	Präzision und Kommunikation	99 102 102 104 107 111 111 112
	4.2 4.3 4.4	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro Circad	Präzision und Kommunikation	<ul> <li>99</li> <li>102</li> <li>102</li> <li>104</li> <li>107</li> <li>111</li> <li>111</li> <li>112</li> <li>114</li> </ul>
	4.2 4.3 4.4 4.5	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro Circad Zellteil	Präzision und Kommunikation	99 102 102 104 107 111 111 112 114 115
	$ \begin{array}{c} 4.2 \\ 4.3 \\ 4.4 \\ 4.5 \\ 4.6 \\ \\ \end{array} $	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro Circad Zelltei Circad	Präzision und Kommunikation	<ul> <li>99</li> <li>102</li> <li>102</li> <li>104</li> <li>107</li> <li>111</li> <li>111</li> <li>112</li> <li>114</li> <li>115</li> <li>117</li> </ul>
	$\begin{array}{c} 4.2 \\ 4.3 \\ 4.4 \\ 4.5 \\ 4.6 \\ 4.7 \\ \end{array}$	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro Circad Zelltei Circad Wirku	Präzision und Kommunikation	<ul> <li>99</li> <li>102</li> <li>102</li> <li>104</li> <li>107</li> <li>111</li> <li>111</li> <li>112</li> <li>114</li> <li>115</li> <li>117</li> <li>117</li> </ul>
	$\begin{array}{c} 4.2 \\ 4.3 \\ 4.4 \\ 4.5 \\ 4.6 \\ 4.7 \\ 4.8 \end{array}$	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro Circad Zelltei Circad Wirku Rhyth:	Präzision und Kommunikation	<ul> <li>99</li> <li>102</li> <li>102</li> <li>104</li> <li>107</li> <li>111</li> <li>111</li> <li>112</li> <li>114</li> <li>115</li> <li>117</li> <li>117</li> <li>119</li> </ul>
5	4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro Circad Zelltei Circad Wirku Rhyth:	Präzision und Kommunikation	<pre>99 102 102 104 107 111 111 112 114 115 117 119 121</pre>
5	4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8 <b>R</b> 5.1	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro Circad Zelltei Circad Wirku Rhyth: Chythme Tagesr	Präzision und Kommunikation	<pre>99 102 102 104 107 111 111 112 114 115 117 117 119 121 122</pre>
5	4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8 <b>F</b> 5.1 5.2	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro Circad Zelltei Circad Wirku Rhyth: Chythme Tagesr Begist	Präzision und Kommunikation	<pre>99 102 102 102 104 107 111 111 112 114 115 117 119 121 122 122</pre>
5	4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8 <b>F</b> 5.1 5.2 5.3	4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 Rhyth: Chloro Circad Zellteil Circad Wirku Rhyth: <b>Chythme</b> Tagesr Regist: Bedeut	Präzision und Kommunikation	<pre>99 102 102 104 107 111 111 112 114 115 117 119 121 122 122 122 122</pre>

	5.3.1 Translations-Membran Modell von Schweiger	. 124
	5.4 Mehrere Oszillatoren?	. 125
	5.5 Interagieren Zellen miteinander?	. 127
6	Cyanobakterien -Tagesrhythmen bei Prokaryonten	129
	6.1 Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryonten	. 131
	6.2 Circadiane Rhythmen	. 131
	6.3 Luciferase-exprimierende Synechococcus	. 135
	6.4 Mutanten finden	. 141
	6.5 Das Uhrwerk des circadianen Systems	. 141
	6.6 Eingänge zur Uhr	. 144
	6.7 Ausgänge	. 144
	6.8 Adaptive Bedeutung der circadianen Rhythmen von Cyanobakterien	. 144
7	Rhythmen der CAM-Pflanzen	147
	7.1 Beispiele, Eigenschaften und Bedeutung des CAM	. 148
	7.1.1 Bedeutung der Vakuole im CAM Stoffwechsel	. 149
	7.2 Biochemie des CAM	. 149
	7.2.1 Kompartimentierung der CAM Enzyme	. 151
	7.2.2 Regulation des CAM	. 151
	7.3 Registrieren	. 152
	7.4 CAM Rhythmen im Licht-Dunkel-Wechsel und unter konstanten Bedingungen	152
	7.5 Modelle	157
8	Blütenuhr Kalanchoe	159
	8.1 Anatomie der Blüten und Mechanismus der Blütenblattbewegung	. 159
	8.2 Registrieren der Blütenblattbewegung	. 161
	8.3 Wie Licht die Blütenblattbewegung beeinflusst	. 161
	8.3.1 Der singuläre Punkt.	. 163
	8.4 Wirkung von Temperatur	. 164
	8.5 Wirkung von Substanzen	. 165
	8.6 Wirkung von Hormonen	. 165
	8.7 Modell der Kalanchoe Blütenuhr	. 167
9	Blüte und Insekt	169
	9.1 Vorteil der Fremdbestäubung	. 169
	9.2 Blumenuhr und Zeitsinn der Bienen	. 170
	9.3 Tagesperiodisches Öffnen von Blüten	. 170
	9.4 Andere Beispiele zum Sichern der Befruchtung	. 171
	9.5 Duftrhythmen	. 172
	9.5.1 Blütenduft	. 172
	9.6 Wirtschaftliche Bedeutung der Bestäubung: Blattschneiderbiene Megachile .	. 174
10	0 Sonnenkompaßorientierung	177

	10.1	Sonner	nkompaßorientierung und Kommunikation bei Bienen	177
	10.2	Sonner	nkompaßorientierung von Strandflohkrebsen	179
		10.2.1	Sonnen- und Mondorientierung am Äquator	181
	10.3	Weiter	e Beispiele für Sonnenkompaßorientierung	181
11	U	hren, d	lie nach dem Mond gehen	183
	11.1	Gezeit	enrhythmen	186
	11.2	Vierze	hntägige Rhythmen	192
		11.2.1	Vierzehntagesrhythmus der Landkrabbe Sesarma haematocheir	192
		11.2.2	Vierzehntagesrhythmus von Clunio	193
	11.3	Monat	srhythmen	198
12	J	ahresrh	ythmen	201
	12.1	Beispie	ele für Jahresrhythmen bei Pflanzen	202
		12.1.1	Samenruhe und Samenkeimung	202
	12.2	Jahres	rhythmen bei Algen	205
		12.2.1	Jahresrhythmus des Phylloidwachstums von Laminarien	205
		12.2.2	Meeresalge mit innerem Kalender	208
	12.3	Weiter	e Beispiele für Jahresrhythmen bei Pflanzen	208
	12.4	Jahres	rhythmen bei Tieren	211
		12.4.1	Jahresrhythmen bei Invertebraten	211
		12.4.2	Jahresrhythmus des dsungarischen Hamsters	212
		12.4.3	Jahresrhythmen bei Vögeln	213
		12.4.4	Beispiele für Winterschlaf	219
		12.4.5	Eigenschaften der Jahresrhythmen	226
		12.4.6	Zeitgeber der Jahresrhythmen, Synchronisation	227
		12.4.7	Physiologische Grundlagen, Lokalisation, Modelle des Jahresrhythmus .	228
	12.5	Geneti	ik der Jahresrhythmen	230
	12.6	Adapti	ive Bedeutung von Jahresrhythmen	230
13	Ρ	hotope	riodismus	<b>235</b>
	13.1	Photop	periodismus bei einer Alge	235
	13.2	Photo	periodismus bei Pflanzen	237
		13.2.1	Photoperiodische Kontrolle von Speicherorganen.	237
		13.2.2	Photoperiodische Kontrolle der Sukkulenz	241
		13.2.3	Andere photoperiodische Wirkungen	241
		13.2.4	Photoperiodische Reaktionen bei Samenruhe und Samenkeimung	241
		13.2.5	Photoperiodismus und Blühen	243
	13.3	Diapaı		259
		13.3.1	Kannenpflanzen-Zuckmücken	259
		13.3.2	Photoperiodismus und Polymorphismus bei Blattläusen ( <i>Hemiptera</i> )	261
		13.3.3	Kartottelkater	264
		13.3.4	Sarcophaga	266
		13.3.5	Drosophila	267

	13.3.6	Diapause beim Seidenspinner	270
	13.3.7	Charakteristika der Diapause	275
	13.3.8	Verschiedene Typen der Diapause	276
	13.3.9	Diapausestadien	276
	13.3.10	Geographische Rassen	276
	13.3.11	Induktion und Termination der Diapause	278
	13.3.12	Photorezeptoren	279
	13.3.13	Zeitmeßsystem	281
	13.3.14	Photoperiodischer Zähler	281
	13.3.15	Modelle	282
	13.3.16	Physiologische Grundlagen, Endokrinologie der Diapause	284
	13.3.17	Modifikation der Diapause	286
	13.3.18	Genetik der Diapause	286
13.4	Photop	periodische Kontrolle der Reproduktion bei Säugern	287
	13.4.1	Einführung und Übersicht	287
	13.4.2	Einige ausgewählte Beispiele: Syrischer und Djungarischer Hamster	288
13.5	Photop	periodismus bei der Wachtel	293
	13.5.1	Systematik, Lebensweise	294
	13.5.2	Photoperiodische Steuerung der Reproduktion	294
	13.5.3	'Hardware'	296
	13.5.4	Was passiert nach der photoperiodischen Induktion?	302
	13.5.5	Melatonin und Pinealorgan	302
	13.5.6	Die circadiane Uhr als Grundlage der photoperiodischen Zeitmessung:	
		Interne Koinzidenz	304
13.6	Photop	periodismus beim Menschen und anderen Primaten?	304
14 U	hren v	on Drosophila: Zeiger, Lokalisation, Steuerung	307
14.1	Schlüp	fen von Drosophila: Ein Populationsrhythmus	307
	14.1.1	Zeitfenster werden von einer Tagesuhr bestimmt	308
	14.1.2	Warum schlüpfen die Tiere nur in Zeitfenstern?	310
	14.1.3	Eigenschaften der Schlüpfuhr	311
	14.1.4	Photorezeptoren zur Synchronisation der Schlüpfrhythmen	314
14.2	Laufak	tivität von Drosophila wird circadian gesteuert	316
	14.2.1	Mutanten	316
	14.2.2	Multioszillatorsystem	321
	14.2.3	Lokalisation der Uhren, die Schlüpfen und Laufaktivität kontrollieren .	322
	14.2.4	Photorezeptoren für die Synchronisation der Laufuhr und Stellen des mo-	
		lekularen Rückkopplungsoszillators	325
	14.2.5	Molekulare Grundlagen circadianer Rhythmen von Drosophila	327
	14.2.6	Molekulare Grundlage der Synchronisation	328
	14.2.7	Molekulare Grundlage der Temperaturkompensation	330
14.3	Rhyth	men und Lebensdauer	330
14.4	Wie w	ird Schlüpfen und Laufen der Fliegen registriert?	332
	14.4.1	Schlüpfrhythmus messen	332

		14.4.2 Laufrhythmus messen:	333
1	14.5	Genetische und molekularbiologische Methoden zum Aufklären von Rhythmen	335
		14.5.1 Entdeckung und erste Untersuchungen	335
		14.5.2 Vorkommen und räumliche Verteilung von PER in den verschiedenen	
		Entwicklungsstadien	336
		14.5.3 Rückkopplungsmodell PER-TIM	336
		14.5.4 Kontrolle anderer rhythmischer Prozesse	337
			001
15	$\mathbf{A}$	ugenuhren von Meeresschnecken	339
1	15.1	Einführung	339
1	15.2	Systematik, Vorkommen, Biologie von Meeresschnecken	339
1	15.3	Morphologie und Anatomie der Augen und der Gehirnganglien	341
1	15.4	Circadiane Rhythmik der CAP, Elektrophysiologie	342
		15.4.1 Mechanismus des CAP Oszillators	349
1	15.5	Synchronisation und Phasenverschiebungen des CAP-Rhythmus	351
		15.5.1 Efferente Einflüsse des Gehirns	351
1	15.6	Mechanismus der Lichtwirkungen	352
1	15.7	Weitere circadiane Zentren?	354
1	15.8	Redeutung der Proteinsynthese für die Tagesrhythmik:	354
1	15.0	Beginflussungen der einendignen Bhythmen	355
1	LU.9 LE 10	Augränge des gizardianen Sustema	257
1	10.10		307 257
1	10.11	Madella des since dienen Constance	201
1	10.12	Modelle des circadianen Systems	358
1	15.13	Evolution retinaler Uhren	359
16	$\mathbf{C}$	ircadiane Bhythmen beim Schimmelpilz <i>Neurospora</i>	363
- 0	161	Vorteile von <i>Neurospora</i> für circadiane Studien	363
1	16.2	Circadiane Bhythmen der Konidienbildung und anderer Vorgänge	365
	10.2	16.2.1 Flüssigkulturen	366
1	63	Wie Licht auf die Konidienbildung wirkt	367
1	16.4	Temperatur-Wirkungen Temperatur-Kompensation	373
1	16.5	Wirkung von Substanzen auf circadiane Bhythmen	375
1	16.6	Wie lägst sich der Mechanismus der einzeldienen Uhr von Neumennen sufflären?	277
1	16.7	Mutationan im girandianan Sustam	201
1		Den Ubr Machanismus von Neuroenene	201
1	10.0	16.8.1 Die Gescher und die Dübere	000 101
		16.8.1 Die Spieler und die Bunne	383
		16.8.2 Das Spiel	386
		10.8.3 Ziele des Spiels	395
1	16.9	Ausgange der Uhr und Kontrolle der Zeiger	396
		16.9.1 Uhr-kontrollierte Gene	396
17	٨	blagerungsrhythmen	300
1	А. 171	Korallonubron	300 399
1	L1.1	Notalienumen	399
1	L <i>1.2</i>	Ruytumische Rutikula-Ablagerungen	400

18	B	edeutung, Evolution und selektive Vorteile circadianer Rhythmen	405
	18.1	Oszillationen gibt es bei allen komplizierten Systemen	405
	18.2	Warum circadiane Rhythmen nicht genau 24 Stunden lang sind	406
	18.3	Selektive Vorteile circadianer Rhythmen	406
	18.4	Modellorganismus für die Evolution circadianer Rhythmen	409
	18.5	Evolution der Temperatur-Kompensation circadianer Rhythmen	412
	18.6	Organisation circadianer Rhythmen und ihre Evolution	412
	18.7	Evolution von Pigmentsystemen und Photorezeptoren für die Synchronisation	
		circadianer Rhythmen	413
	18.8	Evolution des Photoperiodismus	413
	18.9	Konvergente Entwicklung circadianer Rhythmen?	414
	18.10	Wie, wann und warum entwickelten sich circadiane Rhythmen?	414
19	W	ie geht es weiter? Die Zukunft der Chronobiologie	417
20	$\mathbf{S}_{\mathbf{I}}$	pezialthemen	419
	20.1	Circumnutationen bei Pflanzen	419
	20.2	Biologische Bedeutung des REM-Schlafes	424
	20.3	Ontogenie des circadianen Systems beim Menschen	426
	20.4	Chronobiologischer Phasentyp	426
	20.5	Circadiane Rhythmen bei Blinden	428
	20.6	Kontrolle der Körpertemperatur bei Wirbeltieren	428
		20.6.1 Temperaturregulation homöothermer Tiere	429
	20.7	Was ist Schlaf?	431
	20.8	Melatonin	434
	20.9	Synchrone Menstruation bei Kolleg-Studentinnen	437
	20.10	Schizophrenie als Nocturnalismus	438
	20.11	Lithium- Versuche in Spitzbergen	439
	20.12	Beispiele für Biolumineszenz	440
	20.13	Das Phytochromsystem	442
	20.14	Das Auge der Säuger erkennt neben Bildern auch die Zeitstruktur der Umwelt	449
	20.15	Circadian kontrolliertes Sehen beim Pfeilschwanzkrebs	451
	20.16	Formänderungen, Pigmentänderungen und Wanderungen von Chloroplasten	455
	20.17	Geschichte des Photoperiodismus	456
	20.18	Modelle für die photoperiodische Steuerung	460
		20.18.1 Sanduhrmodell	460
		20.18.2 Bünning-Hypothese, externes Koinzidenzmodell	461
		20.18.3 Interne Koinzidenz	461
		20.18.4 Rückkopplungsmodell und Photoperiodismus	463
	20.19	Duftrhythmen	465
	20.20	Arrhythmie	468
	20.21	Genetik circadianer Rhythmen	468
	20.22	Sonnenkompass-Orientierung eines Strandflohkrebses	471
		20.22.1 Sonnen- und Mondorientierung am Äquator	471

Literaturverzeichnis													473
20.23 Zeitreihen-Analyse	 	•	 	•			 •		 •			•	471

# Abbildungsverzeichnis

1	Beispiele für Schwingungen	6
2	Beschreibung von Schwingungen	$\overline{7}$
3	Spektrum von Rhythmen bei Organismen	8
1.1	Chemische Schwingungen in einem geschlossenenen System	14
1.2	Reaktionsschema der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion	15
1.3	Belousov-Zhabotinsky-Reaktion als Wellenmuster	16
1.4	Verlauf der Glykolyse und Rückkopplungen 007y	16
1.5	Induktion der Glykolyse-Oszillation bei einer Hefesuspension	17
1.7	Rhythmische $CO_2$ Bildung bei gärenden und bei atmenden Saccharomyces Kul-	
	turen	18
1.6	Zellteilung in Saccharomyces Kulturen	19
1.8	Gravitrope Pendelbewegung eines Sonnenblumenkeimlings 016y	21
1.9	Zeitlicher Verlauf des gravitropen Pendels eines Sonnenblumenkeimlings $\ .\ .$	22
1.10	Rückkopplungsmodell des gravitropen Pendels 017y	23
1.11	Pendelbewegung exogen oder endogen 018y	24
1.12	Regelmechanismen der Transpiration 019y	25
1.13	Spaltöffnung des Hafers	26
1.14	Transpiration des Hafer-Primärblattes	27
1.15	Schema des Rückkopplungs-Kreises der Transpirationsschwingungen 022 y $$ . $$ .	28
1.17	Pulvinus eines Seitenfieders von Desmodium gyrans	29
1.16	Bewegungen der Endfieder und Seitenfieder von Desmodium	30
1.18	Zellulose-Mikrofibrillen in einer Motorzelle des Pulvinus von $Desmodium$ 025y	30
1.19	Modell des Schrumpfens und Schwellens von Motorzellen von Desmodium 026B	31
1.20	Elektroencephalogramm-Muster des Menschen im Schlaf	33
2.1	Schlaf-Wach-Rhythmus einer Versuchsperson in Isolation	36
2.3	Trink-, Schlaf- und Wachzeiten von Kleinkindern 030y	37
2.2	Freilauf des Schlaf-Wachrhythmus im Normaltag	38
2.4	Kopfuhr des Menschen	39
2.5	Circadianer Rythmus der Müdigkeit	41
2.6	Schlaf-Wach Modell 030Cy	42
2.7	Bimodaler Schlaf	44
2.10	Kerntemperatur- und Fußtemperatur-Rhythmen	45
2.8	Zwei-Prozess-Modell der Schlafregulation	46

2.9	Verlauf der Körpertemperatur des Menschen	47
2.11	Biphasischer Verlauf der Körpertemperatur des Menschen	48
2.12	Interne Desynchronisation beim Menschen 033y	49
2.13	Steuerung der Cortison-Abgabe 034y	51
2.14	Zeitverlauf der Cortison-Konzentration	52
2.15	Menstruationszyklus der Frau	53
2.16	Testergebnisse zum chronobiologischen Phasentyp	56
2.17	Verlauf der Körpertemperatur während einer 1-1-1 Schichtplans	58
2.18	Fehlerhäufigkeit bei Schichtarbeitern	59
2.19	Verträglichkeit von Schichtarbeit	60
2.20	Anker-Schlaf	61
2.21	Zeitzonen-Einteilung der Erde 041y	62
2.22	Verschiebung von Körperfunktionen nach Flügen	65
2.23	Anpassung von Körperfunktionen nach Flügen	66
2.24	Schmerzstillende Wirkung von Novalgin schwankt tagesperiodisch	68
3.1	Hamsterkäfig mit Laufrad	74
3.2	Visuelle Wege von den Augen zum Gehirn beim Hamster	76
3.3	Signaltransduktionskaskade zur Synchronisation von Hamstern durch Licht-	
	Dunkel-Zyklen	78
3.4	Anatomie des Pinseläffchen-Gehirns	79
3.5	Isolation des SCN	81
3.6	Stoffwechsel im SCN	81
3.7	Feuern der SCN Neuronen	82
3.8	SCN-Implantation stellt circadianen Rhythmus wieder her	83
3.9	SCN-Struktur und Funktion	84
3.10	Circadianer Körpertemperaturrhythmus nach SCN Zerstörung	85
3.11	Circadianer Rhythmus der lokomotorischen Aktivität nach SCN Zerstörung $% \mathcal{L}^{(n)}$ .	87
3.12	Circadiane Kontrolle der Zielzellen durch SCN Uhren-Neuronen	88
3.13	Molekulares Modell der circadianen Uhr von Säugern	89
3.14	Neuronale Organisation des circadianen Systems der Säuger	90
3.15	Melatoninwirkung auf circadianen Rhythmus	91
3.16	tau-Mutante des Goldhamsters	92
3.17	Circadianer Rhythmus der <i>clock</i> -Mutante des Hamster	94
4.1	Zellen von <i>Gonuaulax</i>	97
4.2	Rote Tide	98
4.3	Gonyaulax-Lumineszenz	98
4.4	Registrieren des Biolumineszenzrhythmus von Gonyaulax	99
4.5	Glimmrhythmus von Gonyaulax	100
4.6	Temperaturkompensation des Blitzrhythmus von Gonyaulax	101
4.7	Präzision des circadianen Rhythmus bei <i>Gonyaulax</i>	102
4.8	Spektrale Abhängigkeit der Biolumineszenz von Gonuaulax	103
4.9	Phasenresponsekurve auf Lichtpulse bei Gonyaulax	103

4.10	Scintillons von Gonyaulax 053y
4.11	Luciferin von Gonyaulax 054y 105
4.12	Translationale Uhr von Gonyaulax
4.14	Circadiane Synthese des Luciferin-Binde-Proteins von Gonyaulax 107
4.13	Licht-Produktion im Scintillon von Gonyaulax 108
4.16	Unterschiedliche Periodenlängen der Biolumineszenzrhythmen von Gonyaulax 109
4.15	Induktion von Arrhythmie bei Gonyaulax 110
4.17	Schwarmbildung bei Gonyaulax
4.18	A- und B-Oszillator von Gonyaulax und Lichtqualität
4.19	Chloroplastenbewegung bei Pyrocystis noctiluca
4.20	Circadiane Änderung der Chloroplastengestalt von Pyrocystis lunula 113
4.21	Unterschiede in der Anordnung der Thylakoide bei Gonyaulax 114
4.22	Ursachen des Photosynthese-Rhythmus bei Gonyaulax
4.23	Photosyntheserhythmus bei <i>Gonyaulax</i> 115
4.24	Photosyntheserhythmus einer einzelnen Gonyaulax-Zelle
4.25	Circadianer Rhythmus der Zellteilung von Gonyaulax 116
4.26	Circadianer Rhythmus von Enzymen bei Gonyaulax 118
4.27	Creatin-Wirkung auf Gonyaulax 120
5.1	Schirmalge Acetabularia
5.2	Sauerstoffmessung bei Acetabularia
5.3	Sauerstoff-Rhythmus in kernlosen Acetabularia 125
5.4	Pfropfexperimente an Acetabularia
5.5	Translationsmodell des circadianen Rhythmus von Acetabularia
5.6	Temperaturkompensation des circadianen Rhythmus von Acetabularia 128
5.7	Circadiane Chloroplastenwanderung bei Acetabularia
61	Circadianer Bhythmus der Nitrogenase bei <i>Oscillatoria</i> 130
6.2	Diurnale Beweglichkeitsrhythmen bei Prokarvonten
6.3	Bhythmen bei <i>Supechococcus</i> 134
6.4	Kohlenhydratsynthese und Zellteilung von Sunechococcus
6.5	pH Bhythmen durch Swnechococcus
0.5 6 7	Konstrukt mit Luciferase Strukturgen bei Sungehoeneeus
0.1 6.6	Flektronentransport hei der Photosynthese von Cyanobakterian
6.8	Circadianar Bhythmus dar mBNA das pshAL von Sunachagogeus
0.0 6 10	Dhaganraganagalurra auf Light hai Sumgahagagatia
0.10 6 0	Dhagan warsahahana Sumaahaaasaa Kulturan
0.9	Circo dioper Dhythmus von Sameshageseus Mutanten
0.15	Circadianer Knythnus von <i>Synechococcus</i> -Mutanten
0.11	r nasenverschiedung des Diolummeszenzrnytnmus von <i>Synechococcus</i> durch Dunkelpulse
6 1 2	Temperaturkompensation des circadianen Rhythmus bei Sumechococcus 140
6.14	Riickkonnlungsmodell des circadianen Oszillators von <i>Cuanobactoria</i>
6.15	Modell der einendignen Con Expression von Samschasseraus
0.10	moden der chrautanen Gen-Expression von Synechococcus

$7.1 \\7.2 \\7.3 \\7.4 \\7.5 \\7.6 \\7.7 \\7.8 \\7.9$	Kaktus als Beispiel einer CAM-Pflanze148Schema des CAM-Stoffwechsel einer Zelle150Phosphoenol-Pyruvat Bildung155Bedeutung der PEPC-Kinase bei CAM-Pflanzen155Messung des CO2 von CAM-Pflanzen154Tagesrhythmus des Malats bei Kalanchoe155PEPCarboxylase und Malatenzym-Rhythmus155Kohlendioxid-Rhythmus im Dauerdunkel und Dauerlicht156Modell für die circadianen Rhythmen im CAM-Stoffwechsel158
$\begin{array}{c} 8.1 \\ 8.2 \\ 8.4 \\ 8.3 \\ 8.5 \\ 8.6 \\ 8.7 \\ 8.9 \\ 8.8 \\ 8.10 \end{array}$	KalanchoeBlüte und Anatomie der Blütenblätter166Saugkraft und Blütenblattbewegung bei Kalanchoe166Phasen-Response-Kurve auf Licht bei Kalanchoe165Bildanalyse der Kalanchoe165Aktionsspektrum für Phasenverschiebung des Kalanchoe165Arrhythmie bei Kalanchoe166Phasenresponsekurve für Temperaturpulse bei Kalanchoe166Methyljasmonat-Wirkung auf Kalanchoe166Phasenresponsekurve durch ABA-Pulse bei Kalanchoe166Rückkopplungsmodell der Kalanchoe166
9.1 9.2 9.3 9.4 9.6 9.5 9.7	Blumenuhr von Linné177Staubbeutel-Rhythmus bei Parnassia177Nektarabgabe bei Anguria177Duftproduktion bei Stephanotis177Blattschneiderbiene Megachile177Duftstoffe von Blüten177Diapause bei Megachile177
$10.1 \\ 10.4 \\ 10.2 \\ 10.3 \\ 10.5$	Sonnenkompassorientierung der Honigbiene178Sonnenkompaßorientierung des Strandflohkrebses Talitrus180Strandfloh Talitrus181Biotop von Talitrus183Zeitverschiebung bei Talitrus 118y185
$11.1 \\ 11.2 \\ 11.4 \\ 11.3 \\ 11.6 \\ 11.5 \\ 11.7 \\ 11.0 \\ $	Wie die Gezeiten entstehen 119Ay       184         Monatliche Änderungen der Gezeiten       184         Küstenisopode Excirolana       186         Gezeitenzone der Meeresküste 120y       186         Aktivitätsmusters von Excirolana und Gezeiten       186         Aktivitätsmuster von Excirolana im Labor       186         Länge der Schüttelperiode und Form des Gezeitenrhythmus bei Excirolana       196         Ör derum zur im Durchmensen men Helestömmen und Schmucher fr. Gezeiten       196
11.9 11.8 11.10	Anderungen im Durchmesser von Holzstammen und Schwerkraft-Gezeiten

11.11	Versuche an Sesarma	194
11.12	Clunio während der Kopulation	194
11.13	Circadiane und vierzehntägige Uhr bei Clunio 129y	195
11.14	Fundstellen von Clunio von der Atlantik- und Nordseeküste	196
11.15	Populationen von Clunio von der Atlantik- und Nordseeküste	197
11.16	Monatsrhythmus bei Povilla	198
11.17	Trichterbau von Myrmeleon	199
11.18	Vierzehn-Tages-Rhythmus der Flugaktivität von Bienen	199
11.19	Fangen von Palolo-Würmern	200
11.20	Monatsrhythmen des Palolo-Wurms	200
12.1	Entwicklungsgang einer Samenpflanze	203
12.2	Jahresrhythmus der Samenkeimung von Digitalis	203
12.3	Jahresrhythmus der Substanzproduktion bei Lemna	204
12.4	Jahresrhythmus bei Bohnensamen	204
12.5	Jahresperiodische Wasseraufnahme von Bohnensamen	205
12.6	Keimbereitschaft des Samens von Fragaria	205
12.7	Jahresrhythmus der Phylloide von Laminarien	206
12.8	Mitnahmebereich des Jahresrhythmus bei Laminaria	207
12.9	Schlüpfen von Gonyaulax aus den Zysten	209
12.10	Jahresrhythmus der Bewurzelung von <i>Salix</i> -Stecklingen	210
12.11	Jahresrhythmus der Stomatabewegung bei Bohnen	210
12.12	Jahresrhythmus der Diapause und Verpuppung von Anthrenus	212
12.13	Jahresrhythmus der Eiablage bei <i>Limax flavus</i>	212
12.14	Phodopus im Sommer- und Winterkleid 161v	213
12.15	Jahresrhythmen beim dsungarischen Hamster	213
12.16	Jährlicher Brutzyklus und Ankunftszeit von Vögeln	215
12.20	Jahresrhythmus der Gonadengröße und Mauser von Staren	216
12.21	Schema des Jahresrhythmus eines Stares in verschiedenen Licht-Dunkel-Zyklen	217
12.17	Emlen-Käfig zum Messen der Zugunruhe 150v	218
12.18	Circannualer Rhythmus des Fitislaubsängers	218
12.19	Jahresrhythmus des Körpergewichts von Sylvia	219
12.22	Winterschlaf beim Erdhörnchen	220
12.23	Photoperiodische Induktion des Winterschlafes bei <i>Phodopus</i> 174A1x	221
12.24	Jahresverlauf der Körpertemperatur eines Winterschläfers	223
12.25	Täglicher Torpor eines Lemuren	223
12.26	Mitnahmebereich des Jahresrhythmus vom Sikka-Hirsch	228
12.27	Photoperiodismus als Zeitgeber des Jahresrhythmus beim Schaf	229
12.28	Verschieben eines Jahresrhythmus	230
12.29	Kreuzungen zwischen Mönchsgrasmücken	231
12.30	Programmierung des Zugverhaltens bei Sulvia.	232
10.0		
13.2	Photoperiodische Zystenbildung bei Gonyaulax und Melatonin	236
13.1	Zystenbildung bei Gonyaulax	237

13.3	Circadianer Rhythmus der Melatoninbildung bei Gonyaulax	237
13.4	Knollenbildung bei der Kartoffel durch Jasmonat	240
13.5	Kartoffelknollen werden im Kurztag gebildet	240
13.6	Zwiebelbildung bei Allium cepa durch Langtag	241
13.7	Blätter von Kalanchoe im Langtag und Kurztag	242
13.8	Photoperiodische Kontrolle der Samenkeimung von Betula	243
13.9	Kritische Tageslänge bei Kurz- und Langtagpflanzen	244
13.10	Beispiele für Kurztagpflanzen und Langtagpflanzen	245
13.11	Photoperiodische Induktion und Evokation von Blüten	246
13.12	Pfropfung und Photoperiodismus	248
13.13	Unterschiede im Apex vor und nach photoperiodischer Induktion	249
13.14	Kaiserwinde Pharbitis nil	249
13.15	Photoperiodische Induktion der Blütenbildung von <i>Pharbitis</i>	250
13.17	Photoperiodische Empfindlichkeit geographischer Rassen von <i>Pharbitis</i>	250
13.16	Veränderungen des Apex nach photoperiodischer Behandlung	251
13.19	Doppelwirkung des Lichtes	252
13.18	Modell für die photoperiodische Induktion	253
13.21	Blühinduktion bei Chenopodium	253
13.20	Chenopodium rubrum im vegetativen und reproduktiven Zustand	254
13.22	Arabidopsis als fakultative Langtagpflanze	255
13.23	Schema der Blühinduktion bei Arabidopsis	256
13.24	Faktoren und ihre funktionelle Anordnung bei Arabidopsis	257
13.25	Lebenszyklus und Diapause bei Metriocnemus	261
13.26	Diapause von Metriocnemus im Freiland	262
13.28	Photoperiodismus bei <i>Megoura</i>	263
13.27	Photoperiodische Reaktion bei Metriocnemus	264
13.30	Aktionsspektrum der photoperiodischen Induktion bei Megoura	264
13.29	Photorezeptoren für photoperiodische Reaktion bei Megoura	265
13.31	Kartoffelkäfer	266
13.32	Diapause beim Kartoffelkäfer	266
13.33	Diapause bei Sarcophaga 218y	268
13.34	Kritische Tageslänge bei Drosophila	269
13.35	Änderung der kritischen Tageslänge bei arrhythmischer Mutante von Drosophile	a 270
13.36	Lebenszyklus des Seidenspinners Bombyx mori 225y	271
13.37	Diapausehormon von <i>Bombyx mori</i> 226y	272
13.38	Diapause der Embryonen in den Eiern von <i>Bombyx</i>	274
13.39	Photoperiodische Zeitmessung bei Insekten 1989	275
13.40	Obligate und fakultative Diapause	277
13.41	Ökotypen beim Bärenspinner Acronycta und Pieris	278
13.42	Diapause von Antheraea	279
13.43	Tagesgang der Beleuchtungsstärke	279
13.44	Photoperiodische Rezeptoren 204y	280
13.45	Photoperiodische Entscheidung zwischen Diapause und Entwicklung 205y	281
13.46	Photoperiodischer Zähler bei Nasonia	282

13.47	Modell zum photoperiodischen Zähler	283
13.48	Physiologie der Diapause 208y	284
13.49	Diapause des Zünslers <i>Diatraea</i> 209y	285
13.50	Diapause von Sarcophaga	286
13.51	Kreuzungen geographischer Rassen von Drosophila	287
13.52	Goldhamster	288
13.53	Wirkung der Tageslänge auf den Syrischen Hamster	289
13.54	Torpors beim Djungarischen Hamster	291
13.55	Internes Koinzidenzmodell 235x	293
13.56	Photoperiodische Steuerung der sexuellen Aktivität bei Vögeln 236y	294
13.57	Photoperiodische Reaktionen der Wachtel	295
13.58	Jahresrhythmus der Wachtel	297
13.59	Kontrolle der Gonadenfunktion durch die Photoperiode bei Säugern und Vögeln	298
13.60	Circadianes System und Photorezeptoren der Wachtel	299
13.61	Photoperiodische Induktion bei Wachteln	301
13.62	Photoinduktive Phase bei der Wachtel 239Cx	301
13.63	Photoperiodische und Rückkopplungskontrolle des Brütens bei Wachteln 239Yx	303
13.64	Schwankungen der Konzeption beim Menschen im Jahreslauf $\ldots$	305
14.1	Lebenszyklus der Fruchtfliege Drosophila	308
14.2	Schlüpfrhythmus von Drosophila	309
14.3	Synchronisation des Schlüpfrhythmus von Drosophila durch Temperaturwech-	
	sel	311
14.4	Wirkung von Lichtpulsen auf den Schlupfrhythmus von Drosophila	312
14.5	Phasenresponsekurve auf einen Lichtpuls und Temperaturpuls bei Drosophila	312
14.6	Arrhythmie bei Drosophila	313
14.8	Aktionsspektrum Phasen-verschiebenden Lichtes beim Schlupfrhythmus von	914
147	Drosophila	215
14.7	Laufaltivitäta Phythmus von Drosonhila 248 Av	217
14.9	Aktogramm von Drosonhila mit zwoj circadianon Komponenton	200
14.10	Lage der Photorogenteren zur Sunchronisation der eirendignen Laufaktivität	322
14.11	von Drosonhila	323
14 12	Molekulares Modell der <i>Drosonhila</i> Uhr	329
14.13	Temperaturkompensation von <i>Drosophila erklärt durch</i> Goodwin Oszillator	331
14.14	Lebensdauer von <i>Drosonhila</i> unter nicht-24-Stunden-Zyklen	331
14.15	Lebensdauer von Fliegen nach Verschiebung des Licht-Dunkel-Zyklus	331
14.16	Prozentsatz von Fliegen mit circadianem Bhythmus	332
14.17	[Registrieren des Schlüpfrhythmus von <i>Drosophila</i> -Fliegen] Registrieren des	
	Schlüpfrhythmus von <i>Drosophila</i> -Fliegen aus dem Puparium mit teflonisier-	
	ten Trichtern und Infrarot-Lichtschranken am Ende des Trichters (linkes Bild).	
	258/registrieren-dros	333
14.18	Videoregistrierung von <i>Drosophila</i> -Fliegen	334
14.19	Schlüpfrhythmen und Aktogramme von Mutanten von Drosophila	335

$\begin{array}{c} 14.20\\ 14.21 \end{array}$	Schlüpfrhythmen und Aktogramme von Mutanten von Drosophila PER-Verteilung im Gehirn und den optischen Lappen von Drosophila melano-	335
14.22	gaster.255/PER-gehirn-dros	336 336
15.1	Gliederung der <i>Euthyneura</i>	340
15.2	Aplysia seitlich und von oben	341
15.3	Bulla gouldiana (cloudy bubble snail)	341
15.4	Morphologie des Aplysia Auges	342
15.6	Auge von Bulla m06y	342
15.5	Gehirn von Aplysia m05y	343
15.7	Funktionelle Organisation der Bulla Retina	344
15.9	Circadianer Rhythmus der CAP Amplitude und Frequenz	345
15.10	CAP-Rhythmus bei Bulla und Aplysia	346
15.11	Präzision und Wellenform des CAP-Rhythmus von Bulla	347
15.8	CAP-Rhythmus von Aplysia	348
15.12	Temperatur und CAP Rhythmus von Aplysia	348
15.14	Membran-Modell der Augen-Uhr	349
15.13	CAP Rhythmus und Membran-Leitfähigkeit der BRN des Bulla s	350
15.15	Phasenverschiebung des AP Rhythmus durch Lichtpulse	353
15.16	Lichtpuls-Phasenresponsekurven für Bulla und Aplysia	354
15.17	Lithiumionen verlängern die Periode	356
15.18	Periodenlänge des CAP Rhythmus als Funktion des Alters	357
15.19	Minimalsystem eines Oszillators m19y	358
15.20	Komponenten des circadianen Systems m20y	359
15.21	Modell für Entstehung des Rhythmus und der Synchronisation m $21y$	360
15.22	Rückkopplungsmodell des CAP Rhythmus	361
15.23	Verhalten des Rückkopplungsmodells für CAP Rhythmen	362
16.1	Entwicklungszyklus und Generationswechsel von Neurospora 262v	364
16.2	Konidienbildung an Lufthyphen von <i>Neurospora</i>	366
16.3	Circadiane Rhythmen in Flüssigkulturen von Neurospora	368
16.4	Phasenresponskurve der rhythmischen Konidienbildung von Neurospora	369
16.5	Synchronisation der circadianen Konidienbildung bei Neurospora	370
16.6	Dauerlicht unterdrückt Konidien-Rhythmus von Neurospora	371
16.7	Aktionsspektrum von <i>Neurospora</i> und Flavin-Absorptionsspektrum	372
16.8	Temperaturkompensation der Konidienbildung von Neurospora	373
16.9	Temperaturkompensation der Konidienbildung von Neurospora	374
16.10	Temperaturkompensation durch Amplitudenänderung des Oszillators	376

16.11	Ungesättigte Fettsäuren verlängern Konidienrhythmus bei Mutante cel von	
	Neurospora	378
16.12	Gendosis-Effekt von <i>Neurospora</i> -Heterokaryons	383
16.13	Lage und Struktur des frq-Gens von Neurospora	385
16.15	Modell des Rückkopplungs-Oszillators von <i>Neurospora</i>	387
16.16	Temperaturwirkungen auf den frq Oszillator von Neurospora	388
16.14	Molekularer Rückkopplungs-Oszillator nach Goodwin	389
16.17	Expression des sFRQ und des lFRQ bei Neurospora	389
16.18	Wirkung des Licht auf den molekularen Rückkopplungs-Oszillator von Neuro-	
	spora	390
16.19	Wirkung des Lichtes auf den molekularen Rückkopplungs Oszillator von Neu-	
	rospora	391
16.21	Temperaturkompensation des Konidien-Rhythmus bei Neurospora durch	
	Goodwin-Oszillator	392
16.20	Zurücksetzen der Uhr von <i>Neurospora</i> mit Temperaturstufen	393
16.22	Modell von Lakin-Thomas 278y	394
16.23	Maxima der mRNA verschiedener Uhr-kontrollierter Gene von Neurospora	397
17.1	Koralle mit Hartskelett-Fuß	399
17.2	Schichten in fossilen Korallen-Füßen 281y	401
17.3	Schichtenbildung im Fuß einer fossilen Koralle	402
17.4	Tagesperiodische Chitinschichten bei Küchenschaben	403
10.1		100
18.1	Selektions-Experimente an Cyanobakterien	408
18.4	Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert nicht den Formwechsel von Thalassomyxa	410
18.2	Formanderung bei Thalassomyxa	410
18.5	Kombinierte Zeitgeber synchronisieren den Formwechsel von Thalassomyxa	411
18.3	Formanderung von Thalassomyxa hangt von der Temperatur ab	412
18.6	Zeitskala der Entwicklung der Erde und der Organismen	415
18.7	Koordination Cytobiont und Wirtszelle durch Rhythmen 282Xx	416
20.1	Streckung des Hypokotyls von Arabidonsis	420
20.1	Struktur und Aminosäure Sequenz des Expansins	420
20.5	Lockern der Zellwand Struktur durch Expansin 014v	4 <u>2</u> 1
20.4	Multinetz Modell der Zellwand	421
20.2	Kalium Verteilungen windenden Behnenrenken	422
20.5 20.6	Kanuni-vertenungen windenden Donnennanken	420
20.0	Abbau des Molstoning durch Light über Superovideniegen 284v	401
20.7	Abbau des Melatonins durch Licht über Superoxidanionen 284x	430
20.8	Lithium Salza walänger den eine dienen Dhathmus heim Menschen	430
20.9 20.10	Dishuminaszenz bai ainem Köfen und ainen Ouslis	441
20.10 20.11	Diotummeszenz bei emem Kaier und emer Qualle	441
20.11	Chamicala Chamleton des Distrations Claudi	443
20.12	Unemische Struktur des Phytochrom-Uhromophors	444
20.13	Absorptions- und Aktionsspektren von Phytochrom	445

20.14	Struktur des Holophytochroms	445
20.15	Phytochrom und De-Etiolierung von Keimlingen	446
20.17	Phytochrome-Molekül	447
20.16	Phytochrom als Schalter bei morphogenetischen Vorgängen	448
20.18	Phytochromsynthese	448
20.19	Zwei-Punkte-Kontakt-Modell des Phytochroms	450
20.20	Circadianer Rhythmus des ERG des Skorpion-Auges	453
20.21	Circadiane Änderungen der Transmission des Dictyota Thallus	457
20.22	Sanduhrmodell der photoperiodischen Zeitmessung	461
20.23	Bünning-Modell	462
20.24	Externes Koinzidenzmodell	462
20.26	Simulation von Oszillationen mit einem Rückkopplungsmodell	464
20.25	Internes Koinzidenzmodell	465
20.28	Simulation von Oszillationen unter verschiedenen Licht-Dunkel-Zyklen	466
20.29	Apparatur zum Sammeln von Duftproben 286y	467
20.31	Rhythmische Abgabe von Duftstoffen durch Blüten von Saponaria	468
20.27	Simulation von Oszillationen und photoperiodische Experimente bei Chenopo-	
	dium	469
20.30	Gaschromatogramm einer Headspace-Probe von Saponaria	469

# Tabellenverzeichnis

1.1	Pflanzen mit circadianer Kontrolle der Transpiration	28
$2.1 \\ 2.2$	Zeitzonen-Tabelle	63 64
4.1	Unterschiede zwischen Blitz- und Glimmrhythmus von $Gonyaulax \ polyedra$	101
6.1	Die wichtigsten Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryonten.	132
13.1	Speicherorgane von Pflanzen.	238
$\begin{array}{c} 14.1 \\ 14.2 \end{array}$	Mutanten von <i>Drosophila</i> mit geänderten circadianen Eigenschaften Augenmutanten von <i>Drosophila</i>	318 320
16.1	Clock Gen Mutanten bei Neurospora	382
$20.1 \\ 20.2$	Verschiedene Eigenschaften der Circumnutationen	$\begin{array}{c} 423 \\ 438 \end{array}$
20.3	Kontrolle verschiedener Prozesse von Pflanzen durch das Phytochromsystem	443

Alle Schöpfung schwingt im Reigen, Freude heißt ihr hohes Lied.

Nur der Mensch will sich nicht beugen, jagt nach fremdem Glück sich müd.

Freunde, sucht den Sinn der Dinge, daß auch Freude euch durchdringe.

(v. Goethe)

Dieses Buch wurde mit LYX geschrieben, einem mächtigen Dokument-Schreibprogramm. Es verwendet das  $IaT_EX$  Setzsystem (siehe http://www.lyx.org/).

Copyright 1998 by Wolfgang Engelmann.

Die englische und deutsche Version stehen unter http://bioclox. bot. biologie.unituebingen.de/ zur Verfügung. Die web-Seiten wurden von Dirk Engelmann kreiert und werden von ihm auf dem Laufenden gehalten. Die beiden Versionen sind außerdem über TIBS des Zentrums für Datenverarbeitung der Universität Tübingen (Deutschland) zugänglich (http://).

Dank an Dirk Engelmann (sehr viel technische Hilfe), Charlotte Förster (Drosophila, technische Hilfe), Maroli Chandrashekaran (Korrekturen im Kapitel 'Ultradian rhythms '), Heather Silyn-Roberts (Korrekturen), Lyx User Group (besonders Herbert Voss, Hilfe bei Text-Setzen mit Lyx/Latex), Patricia Lakin-Thomas (Neurospora), Till Roenneberg (Gonyaulax), Rüdiger Hardeland (Pyrocystis images, Informationen), Stephan Michel (Bulla und Aplysia Informationen), Martha Merrow (Neurospora), John Dittami (Korrekturen) and P. Reinhard (Korrekturen) und Studenten (Praktika). 

### Für den Leser

Du wirst dein Werk nicht vollenden, aber du kannst nicht davon ablassen.<sup>1</sup>

Dieses Manuskript ist aus einer Reihe von Vorlesungen entstanden, die ich an der Universität Tübingen gehalten habe. Sie sollten dem Hörer zeigen, wie weit Rhythmen in biologischen Systemen verbreitet sind, in welcher Vielfalt sie vorkommen, wie interessant es ist, sich mit diesen Vorgängen zu beschäftigen, und wie wenig wir noch über die Mechanismen wissen, die diese Rhythmen hervorbringen.

Da das Gebiet inzwischen sehr groß geworden ist, kann nur eine Auswahl aus den vielen Beobachtungen, Untersuchungen und Schlußfolgerungen vorgestellt werden. Sie ist verständlicherweise sehr subjektiv. Ich habe versucht, die einzelnen Kapitel so zusammenzustellen, daß sie die Vielfalt der Themen wiederspiegelt, aber auch einen gewissen roten Faden erkennen lassen.

Für einen Einzelnen ist es sehr schwierig, die vielen Mosaiksteine so zusammenzufügen, daß ein Gesamtbild entsteht, in dem der Wald noch vor Bäumen gesehen wird. Andererseits sind es die Bäume, die den Wald ausmachen. Und wenn sie verschwommen gemalt werden, ist auch der Wald diffus. Deshalb sind bestimmte markante Bäume herausgehoben worden, die ausführlich beschrieben werden. Sie dienen auch als Orientierungs- und Aussichtspunkte.

Viele interessante Themen und Untersuchungsobjekte sind nicht oder nur knapp erwähnt. Deshalb möchte ich die Experten unter den Lesern bitten, hier einzusteigen und ihr Wissen zur Verfügung zu stellen. Stellen Sie Bildmaterial oder Text zur Verfügung, geben Sie Buchtitel, Review-Artikel und Adressen im Internet an, auf die verwiesen werden kann (Ihre homepage, Literaturstellen und mehr). Allen Lesern wäre ich dankbar, wenn Sie mich auf Fehler hinweisen, Kritik üben und Verbesserungsvorschläge machen würden.

Die Qualität des Buches läßt noch zu wünschen übrig. Einige Kapitel müßten überarbeitet oder auf einen neuen Stand gebracht oder völlig neu geschrieben werden. Ich fürchte jedoch, daß sich das noch einige Zeit hinziehen wird. Da das Buch trotz vieler Mängel vielleicht von Nutzen und Hilfe sein kann, habe ich mich entschieden, es im Internet in der jetzigen Form zur Verfügung zu stellen. Es wird später durch verbesserte Versionen ersetzt werden. In einem

Beschwerde-Kasten weise ich auf Kapitel oder Abschnitte hin, in denen Verbesserungen besonders nötig sind oder Hilfe von anderen erwünscht ist

Das Buch wurde Anfang 2002 zunächst in Englisch veröffentlicht, um auch international zugänglich zu sein. Die Idee ist, dieses Werk im Internet wachsen zu lassen und dann, wenn eine vernünftige Größe und Güte erreicht ist, eine 'Compact Disk' (oder vielleicht ein anderes Medium) herzustellen, die Text, Illustrationen und kurze Filmstücke enthält. Sie kann im Laufe der Zeit neu aufgelegt werden. Um dieses Gebiet der Rhythmen bei Organismen auch bei jungen Leuten bekannt zu machen, damit

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>(Mischna, Sprüche der Väter II,16)

sie sich dafür interessieren und sich vielleicht auch intensiver damit beschäftigen, würde eine solche CD sicherlich einen guten Einstieg bieten. Andere Arbeitsgruppen (zum Beispiel Gerda und Günther Fleissner in Frankfurt) arbeiten ebenfalls an solchem Informationsmaterial. Meine EMail Adresse ist Engelmann@unituebingen.de.

Für Beobachtungen, Untersuchungen und Experimente auf dem Gebiet der Chronobiologie gibt es ein Buch Engelmann (1999). Es steht im Internet zur Verfügung (http://bioclox.bot.biologie.uni-tuebingen.de/ und unter TIBS des Zentrums für Datenverarbeitung der Universität Tübingen (Deutschland)). Auf Themenkreise, die dort ausführlich beschrieben sind, wird im vorliegenden Buch verwiesen.

### Einführung in das Thema

Rhythmen<sup>2</sup> sind eine Eigenschaft aller komplexen Systeme. Ingenieure verbringen viel Zeit, um zu verhindern, daß beispielsweise Motoren schwingen und dadurch Gebäude oder Karosserien mitschwingen. Auch Brücken können durch Winde oder durch den Verkehr zum Schwingen kommen und dadurch Schaden erleiden. Deshalb war es früher verboten, daß Soldaten im Gleichschritt über Brücken marschierten, weil sie unter Umständen durch Resonanz einstürzen konnten. Rhythmen in der Wirtschaft sind weit verbeitet und Objekt staatlicher und privater Spekulationen. E. R. Dewey ist zum Millionär geworden, indem er diese Rhythmen beobachtete und Aktien zu den günstigsten Zeiten kaufte und verkaufte Dewey and Dakin (1947) (oberer Teil der Abbildung 1).

Wie man dabei vorgeht, ist sehr einfach und wird am besten am Schweinezyklus illustriert: Der Verkauf von Schweinen bringt gutes Geld. Viele Bauern schaffen sich deshalb neu oder mehr Schweine an. Eine Weile geht das gut, bis der Markt gesättigt ist. Dann fallen die Preise, bis es sich nicht mehr lohnt, Tiere zu halten. Das Angebot auf dem Markt sinkt, die Preise steigen und der Schweinezyklus beginnt von neuem. Kluge Bauern verhalten sich antizyklisch.

Ähnliche Interaktionen findet man bei Räuberund Beute- Populationen. Wenn viele Beutetiere in einem Gebiet leben, können sich die Räuber gut bedienen und stärker als sonst vermehren. Die angewachsene Räuberpopulation dezimiert aber die Beute. Schließlich gibt es nicht mehr genug Nahrung, die Räuber vermehren sich weniger stark und die Beutepopulation kann sich erholen. Zum Räuber-Beute-Modell siehe Engelmann (1999).

Auch bei Organismen findet man zahlreiche Rhythmen. Das ist nicht verwunderlich, da diese ja auch komplizierte Systeme sind und deshalb zum Schwingen neigen. Wir finden Schwingungen im Stoffwechsel, in physiologischen Abläufen, bei der Fortpflanzung, im Verhalten. Manche dieser Schwingungen sind schädlich und die Lebewesen versuchen, sie zu unterbinden. In vielen Fällen haben sich aber die Organismen Rhythmen zu Nutze gemacht. Chemische Reaktionen oder physiologische Abläufe können für den Organismus oft günstiger sein, wenn sie rhythmisch erfolgen. Das gilt besonders für solche Vorgänge, die von rhythmischen Umweltbedingungen abhängen: Die Photosynthese kann nur im Licht ablaufen. Die Stickstoff-Fixierung mancher Cyanobakterien verläuft dagegen im Dunkeln, weil das Enzym dieser Reaktion durch Sauerstoff gehemmt wird. Bei der Photosynthese entsteht bekanntlich Sauerstoff. Deshalb sorgt ein Tagesrhythmus dafür, daß Photosynthese und Stickstoff -Fixierung zeitlich getrennt ablaufen (siehe Seite 131).<sup>3</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Rhythmen sind periodisch sich wiederholende Vorgänge. Physiker benutzen den Ausdruck Oszillationen.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Bei bestimmten Cyanobakterien werden allerdings diese nicht miteinander verträglichen Vorgänge räumlich voneinander getrennt: Die Stickstoff-Fixierung findet in Heterozysten statt.



Abbildung 1: Beispiele für Schwingungen. Oben: Neun-Jahres-Rhythmus der Großhandelspreise, prozentuale Abweichungen vom gleitenden dreijährigen Mittel von 1830 bis 1940 (nach Dewey and Dakin (1947)). Unten: Oszillationen in Populationen von Räubern und Beutetieren, Modellrechnung, Zahl der Tiere in der Beute- und Räuberpopulation in Abhängigkeit von der Zeit (Jahre). Nach Wedekind and Wöhrmann (1983). 001/oszillation



Abbildung 2: Beschreibung von Schwingungen: Ein Organismus mit einem endogenen (inneren) Oszillator wird durch den Licht-Dunkel-Wechsel (LD) der Umwelt synchronisiert (im Beispiel 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit). Die Periodenlänge beträgt 24 Stunden. Danach wird Dauerlicht (LL) angeboten. Nun zeigt der Organismus 'Freilauf´ mit einer Periodenlänge, die kürzer ist als 24 Stunden. Außerdem dämpft in diesem Fall der Rhythmus im Dauerlicht aus. Phase  $\phi$  ist ein Zeitpunkt auf der Kurve, Periodenlänge  $\tau$  ist der Zeitraum zwischen entsprechenden Phasen wie zum Beispiel zwei aufeinander folgende Maxima der Schwingung, Amplitude Awird allgemein benutzt, um den y-Wert eines Punktes auf der Kurve mit der Phases  $\phi$  zu bezeichnen, aber auch, um den y-Wert des Maximums zu charakterisieren (eigentlich sollte dieser Wert 'Maximalamplitude´ heißen). Phasenbeziehung  $\psi$  ist der Zeitraum zwischen Maximum und einem äußeren Ereignis wie zum Beispiel dem Wechsel zwischen Dunkelheit und Licht. 002/r-eigenschaften

Es wird an Beispielen gezeigt, welche Eigenschaften Rhythmen haben und wie man einen Rhythmus beschreibt und registriert. In Abbildung 2 sind dazu die wichtigsten Begriffe Periodenlänge  $\tau$ , Phase  $\phi$ , Amplitude A und Phasenbeziehung zu einem Licht-Dunkel-Wechsel  $\Psi$  erklärt.

Das Spektrum der Rhythmen bei Organismen reicht von *ultradianen Rhythmen* im hochfrequenten Bereich (Millisekunden bis Stunden) über *Tagesrhythmen* (sogenannte circadiane Rhythmen), *Gezeitenrhythmen*, *Monats*und *Vierzehntagesrhythmen*, *Jahresrhythmen*, bis hin zu noch längeren Rhythmen mit Perioden von mehreren Jahren. Zu letzteren gehören oft die schon erwähnten Rhythmen zwischen Populationen von Räubern und Beutetieren. Aber auch Entwicklungszyklen von Organismen ('Er ist so alt, daß er den Bambus zweimal blühen sah', Asiatisches Sprichwort; McClure (1966)) (Abbildung 3).

Mit rhythmischen Vorgängen bei Organismen, ihren Ursachen und ihrer Bedeutung beschäftigt sich die *Chronobiologie*. Sie erforscht die (rhythmische) Zeitstruktur von Lebewesen, Populationen und Ökosystemen.



Abbildung 3: Spektrum von Rhythmen bei Organismen (beachten Sie die unterschiedlichen Zeitachsen): a: Als Beispiel für ultradiane Rhythmen das Feuern einer Nervenzelle, b: als Beispiel für Tagesrhythmen die Tag- und Nachtstellung von Kleeblättern, c: als Beispiel für Gezeitenrhythmen die Schwimmaktivität eines Küstenfisches *Lipophrys pholis* (nach Gibson (1965)), d: Als Beispiel für für einen Vierzehn-Tage-Rhythmus die Eiablage des Ährenfisches *Leuresthes tenuis* (nach Walker (1949)), e: Als Beispiel für Monatsrhythmen das Abschnüren der Stolonen des Polychäten *Typosyllis prolifera* (nach Franke (1986)), f: als Beispiel für Jahresrhythmen die Veränderung des Körpergewichtes beim Erdhörnchen *Spermophilus lateralis* (nach Gwinner (1986)), g: als Beispiel für einen noch längeren Rhythmus mit Perioden von mehreren Jahren das Blühen des Bambus (Daten aus McClure (1966)). 003/spektrum-r

## Übersicht über dieses Buch

Zunächst werden wir Beispiele für Rhythmen kennenlernen. Unter den ultradianen Rhythmen besprechen wir genauer einen chemischen Oszillatore, den Glykolyse-Oszillator der Hefe, das gravitrope Pendel, Transpirationsrhythmen beim Hafer, die Seitenfiederbewegung der Telegrafenpflanze, die Circumnutation bei Pflanzen und den REM-Schlaf der Säuger.

Die circadianen Uhren des Menschen steuern Schlafen und Wachen, die Aktivität und die Körpertemperatur und zahlreiche weitere Vorgänge im Körper. Das circadiane System kann durch Schichtarbeit und Jetlag gestört werden. Im Extremfall kann es zu Krankheiten kommen oder aber Krankheiten können das circadiane System beeinflussen. Damit befaßt sich die Chronomedizin, Chronohygiene und Chronopharmakologie.

Wie diese Rhythmen funktionieren und sich beeinflussen lassen, kann besser an Tieren als am Menschen untersucht werden. Unter den Säugern haben sich dafür Hamster und Mäuse bewährt. Ihre lokomotorische Aktivität und Körpertemperatur läßt sich kontinuierlich messen. Da beide Vorgänge circadian gesteuert werden, eignen sie sich als 'Zeiger' des circadianen Mechanismus, so wie der Zeiger einer Uhr uns verrät, daß hinter ihm ein Uhrwerk steckt. Wie funktioniert dieses circadiane System? Besteht es aus einem Zentraloszillator, der alle Zeiger im Körper steuert? Oder sind es mehrere oder gar viele Oszillatoren, die von einem Zentraloszillator kontrolliert werden? Wie interagieren sie miteinander, wenn es mehrere Zentren gibt?

Wo sind diese Oszillatoren lokalisiert?

Bei Säugern wurde gefunden, daß ein solches Zentrum im suprachiasmatischen Kern (SCN) des Hypothalamus im Gehirn lokalisiert ist. Auch die Zirbeldrüse (*Pinealorgan*), und ein Hormon dieser Drüse, das Melatonin, spielen eine wichtige Rolle. Durch das Pinealorgan und Melatonin wird die Information 'Dunkelheit' übermittelt. Sie kann photoperiodische Reaktionen steuern, mit denen viele Säuger der gemäßigten und höheren Breitengrade sich an die Änderungen der Jahreszeiten anpassen. Der Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert das circadiane System. Aufgenommen wird das Licht über die Retina des Auges, möglicherweise aber auch über andere Photorezeptoren.

Circadiane Rhythmen gibt es nicht nur beim Menschen und anderen Säugern, sondern im gesamten Organismenreich.

Auch *Einzeller* haben solche Uhren, wie zum Beispiel die marine Panzeralge *Gonyaulax*. Diese einzellige Alge zeigt ein schwaches Glimmen, das oft in der Nacht an der Oberfläche der Ozeane beobachtet werden kann. Wie die Biolumineszenz zustande kommt und rhythmisch kontrolliert wird, ist recht gut untersucht worden. Neben diesem Biolumineszenzrhythmus gibt es bei *Gonyaulax* auch einen Zellteilungsrhythmus und einen Aggregationsrhythmus. Weitere Tagesrhythmen sind bei der einzelligen Schirmalge *Acetabularia* gefunden worden. Sogar Prokaryonten besitzen einen Tagesrhythmus. Er kontrolliert unter anderem die Photosynthese und Stickstoff-Fixierung bei

#### Cyanobakterien.

Bei höheren Pflanzen sind vor allem Tagesrhythmen der *Photosynthese* und *Transpiration*, der *Blattbewegung*, der *Teilung* und des *Wachstums* studiert worden. Pflanzen trockener Standorte benutzen Tagesrhythmen, um zu überleben. Sie können mit Hilfe des *CAM-Stoffwechsels* nachts Kohlensäure fixieren und deshalb ihre Spaltöffnungen am heißen Tag geschlossen halten. Die Aktivität eines Schlüsselenzyms des CAM-Stoffwechsels, die PEP-Carboxylase, wird tagesperiodisch moduliert.

Eine dieser CAM-Pflanzen ist Kalanchoe blossfeldiana. Ihre Blüten öffnen und schließen sich tagesperiodisch. Der Mechanismus ist einfacher als bei durch Gelenke gesteuerten Blatt-Bewegungen. Der Rhythmus der Kalanchoe-Blüten wurde intensiv untersucht und einige Ergebnisse werden vorgestellt.

Viele Blütenpflanzen öffnen und schließen ihre Blüten tagesperiodisch und/oder strömen zu bestimmten Zeiten *Düfte* aus, die Insekten, Vögel oder Fledermäuse anlocken. Damit wird die Befruchtung gesichert und Selbstbefruchtung vermieden. Sowohl die Pflanzen als auch die Befruchter benutzen dabei auch zeitliche Anpassungen. Auch die Insekten, die solche Pflanzen befruchten, sind mit Tagesrhythmen ausgestattet. Sie helfen ihnen bei der Orientierung in Zeit und Raum. Der Zeitsinn der Bienen und die *Sonnenkompaßorientierung* gehören dazu.

Beispiele für *Gezeitenrhythmen* stammen vor allem aus dem Küstenbereich der Meere. Bei Organismen dieser Biotope gibt es auch Uhren, die 'nach dem Mond gehen'. Es handelt sich um *Monatsrhythmen* (Periodenlängen von 28 Tagen) und *Zweiwochen-Rhythmen* (Periodenlängen von 14 Tagen).

Jahresrhythmen sind bei den Lebewesen weit verbreitet. Sie können auch auftreten, wenn die Organismen unter Bedingungen gehalten werden, die keine zeitlichen Änderungen der Umwelt mehr enthalten. Solche Jahresrhythmen kommen bei Samen der Pflanzen vor, bei Insekten, bei Schnecken. Sie sind sogar bei einer einzelligen Alge beobachtet worden Vor allem aber sind sie bei Vögeln gut untersucht und stehen in enger Beziehung zum Vogelzug. Bei Säugern werden Fortpflanzung und Winterschlaf durch einen Jahresrhythmus kontrolliert. Selbst beim Menschen scheint es noch Vorgänge zu geben, die jahresperiodisch beeinflußt werden. Die Bedeutung der Jahresrhythmen wird beleuchtet.

Diese Jahresuhr wird photoperiodisch auf die Jahreszeit eingestellt. Sie muß ja, wenn sie endogen läuft (also auf einem inneren Oszillator beruht) mit der Außenwelt synchronisiert werden. Dazu wird von den Organismen die Tageslänge gemessen, die sich im Laufe des Jahres gesetzmäßig ändert. Sie ist vor allem in den Äquator-ferneren Gebieten der verläßlichste Zeitgeber des Jahres. Die *Photoperiode* bestimmt, ob Knollen und Zwiebeln gebildet werden, ob Pflanzen sukkulent werden, Samen in einen Ruhezustand übergehen oder zu keimen beginnen, Pflanzen zu blühen beginnen, Insekten in ein Ruhestadium eintreten, Vögel und Säuger sich fortpflanzen.

In einem weiteren Kapitel beschäftigen wir uns mit den Uhren von *Drosophila*: Ihren Zeigern, ihrer Lokalisation und dem Mechanismus der Steuerung. Hier wurde in den letzten Jahren der Mechanismus des circadianen Systems auch molekularbiologisch intensiv untersucht.

An den Augennerven bestimmter Meeresschnecken können auch im isolierten Zustand circadiane Aktionspotentiale abgeleitet werden. Die dafür verantwortlichen Oszillatoren liegen in basalen Zellen der Augen.

Von *Pilzrhythmen* und *Korallenuhren* wird im darauf folgenden Abschnitt berichtet. Der Brotschimmel *Neurospora* bildet Sporen nur zu bestimmten Tageszeiten. Es handelt sich um einen circadianen Rhythmus, der auch molekularbiologisch untersucht wurde. Schichtenbildungen gibt es bei Korallen. An fossilen Korallenfüßen ('Epithok') läßt sich zeigen, daß die Tage in früheren Erdepochen kürzer waren und deshalb ein Jahr mehr als 365 Tage hatte.

Welche *Bedeutung* und *selektiven Vorteile* haben alle diese Rhythmen für die Organismen und ihre Evolution? Das wird in einem weiteren Kapitel besprochen. Wie sich dieses Gebiet weiter entwickeln mag, welche Brennpunkte der Forschung es gibt, wird ebenfalls angesprochen.

Schließlich gibt es eine Sammlung von *Spezialthemen* im Kapitel 20, die bestimmte Dinge vertiefen oder illustrieren (noch unvollständig oder nur geplant: Hier ist Ihr Beitrag besonders erwünscht).

In dieser Einführung in die Chronobiologie wird auch an den verschiedenen Stellen auf Versuche hingewiesen, die in Praktika durchgeführt werden können und die in einem Praktikumsbuch (Engelmann (1999) unter http://bioclox.bot.biologie.uni-tuebingen.de/) beschrieben sind.

### Kapitel 1

### Ultradiane Rhythmen

Ultradiane Rhythmen sind periodische Vorgänge im Minuten- bis Stundenbereich und unter Organismen weit Aberverbreitet. auchchemische Reaktionen können oszillieren, wie am Belousov-Zhabotinsky-Oszillator demonstriert wird. Neben zeitlichen Schwingungen finden sich hier auch räumliche Wellenmuster chemischer Aktivitäten. Bei Hefe läßt sich eine ultradiane Schwingung der NADH-Fluoreszenz demonstrieren. Sie beruht auf oszillierenden Vorgängen während der Glykolyse und kommt durch Rückkopplungen zwischen einzelnen Reaktionsschritten zustande. Sonnenblumenkeimlinge und andere Pflanzen zeigen nach Schwerkraftreizung gravitrope Pendelbewegungen. Die betreffenden Hypokotyle, Stengel oder Stiele pendeln unter geeigneten Bedingungen in der Ebene, in der sie durch die Schwerkraft gereizt wurden. Circumnutationen sind beim Wachsen von Pflanzen oft zu beobachten: Die Spitzen der Keimlinge wachsen nicht einfach nach oben, sondern machen beim Strecken kreisförmige oder elliptische Bewegungen. Wir werden die Vorgänge am Hypokotyl von Arabidopsis thaliana genauer kennenlernen.

Auch die Transpiration von Gräsern über die Spaltöffnungen kann rhythmisch verlaufen. Sowohl die Wasserabgabe über die Blätter als auch die Wasseraufnahme über die Wurzeln erfolgt rhythmisch. An der Telegrafenpflanze Desmodium gyrans zeigen die Seitenfieder schnelle Auf- und Ab- oder Drehbewegungen, die auf Turgoränderungen in speziellen Gelenken basieren. Schließlich wird der REM-Schlaf der Säuger als weiteres Beispiel für ultradiane Rhythmen vorgestellt.

#### 1.1 Chemische Oszillatoren

Zwar gehören chemische Oszillatoren streng genommen nicht zum Thema des Buches ('Rhythmen des Lebens'), aber sie demonstrieren auf eindrückliche Art, wie auch relativ einfache chemische Systeme oszillierend reagieren können. Deshalb soll hier kurz auf eine dieser chemischen Schwingungen eingegangen werden, die Belusov-Zhabotinskii-Reaktion. Die Reaktion wurde 1958 von Belousov (Belousov (1958)) entdeckt und von Zhabotinskii und Mitarbeitern (Zhabotinsky (1964)) näher untersucht. Nach den Gesetzen der Thermodynamik nimmt bei allen spontanen chemischen Veränderungen in homogenen, abgeschlossenen Systemen die freie Enthalpie<sup>1</sup> dieses Systems ab. Demnach wären keine Oszillationen zu erwarten. Bei bestimmten Bedingungen können aber die Konzentrationen von Zwischenprodukten um die erwarteten Werte im stationären Zustand oszillieren (Abbildung 1.1). Dazu darf die Reaktion noch nicht im Gleichgewicht sein.



Abbildung 1.1: Verlauf einer chemischen Schwingung in einem geschlossenenen System, bevor das Gleichgewicht (horizontale gestrichelte Linie) erreicht ist (nach Degn (1972)). Auf der y-Achse ist die Konzentration eines Zwischenproduktes aufgetragen. 004/chem-osc

Die Reaktion besteht aus zwei Gesamtreaktionen A und B, die sich wenig beeinflussen, da A nur Ionen und Moleküle mit gepaarten Elektronenspins (Singlets), B nur radikalische Reaktionen aufweist. Ob A oder B dominiert, hängt von der Konzentration des Br<sup>-</sup> ab. Bei hoher Konzentration dominiert A, bei niedriger B. A verbraucht Br<sup>-</sup>; dadurch wird die Reaktion B induziert. B produziert Br<sup>-</sup>; dadurch wird A induziert (Abbildung 1.2). Näheres siehe Field (1974), Winfree (1980). Die gleichen chemischen Vorgänge sind für ein Wellenmuster verantwortlich. Es entsteht, wenn man die Lösungen in eine flache Schale gießt und ungestört stehen läßt. Allerdings spielt dabei die Diffusion von Bromionen eine Rolle, weil nicht gerührt wird (Abbildung 1.3).

Wie die meisten ultradianen Rhythmen hängt auch bei diesem chemischen Oszillator die Periodenlänge stark von der Temperatur der Lösung ab. Bei 10<sup>0</sup>C höherer Temperatur ist die Periode nur noch halb so lang.

Für Versuche zu chemischen Oszillatoren siehe Engelmann (1999).

#### 1.2 Glykolyse-Oszillator

Zellen können auf drei verschiedene Arten Energie produzieren: durch Photosynthese, durch Atmung und durch Glykolyse. Glykolyse wird von Organismen betrieben, die ohne Sauerstoff leben, wie Joghurt-Pilze, Bakterien im Sauerkraut, parasitische Würmer, rote Blutkörperchen, tauchende Vertebraten.

Bei der Glykolyse wird Glukose in Pyruvat umgewandelt. Dabei entsteht ATP als Energieträger. Neun verschiedene Enzyme sind bei dieser Umwandlung beteiligt (Abbildung 1.4).

Duysens and Amesz (1957) fanden, daß die Glykolyse der Hefe nicht immer gleichmäßig abläuft, sondern unter bestimmten Bedingungen auch rhythmisch. Das geschieht beim Vergären von Glukose durch Hefe. Ohne Sauerstoff entsteht Alkohol. Die biochemischen Vorgänge der Glykolyse-Oszillationen der Hefe Saccharomyces sind gut untersucht. Wenn man die verschiedenen enzymatischen Reaktionen als Gleichungen miteinander verknüpft, ergeben sich Schwingungen in einzelnen Reaktionsschritten. Schwingungen findet man tatsächlich auch im Experiment, wenn man einer Suspension von Hefezellen Glukose als Substrat zufügt (Betz and Chance (1965)). Sie können am einfachsten durch die Fluoreszenz der NADH gemes-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>eine thermodynamische Eigenschaft eines Systems, die als H=U+PV (H Enthalpie, U interne Energie des Systems, P Druck der Umgebung auf das System, V Volumen des Systems) definiert ist


Abbildung 1.2: Reaktionsschema der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion mit den beiden Haupreaktionen A und B. A: Bromid und Bromat bilden mit der Malonsäure Brommalonsäure. Das Ferroin ist zunächst durch dreiwertiges Eisen blau (Bromat oxidiert  $Fe^{2+}$  zu  $Fe^{3+}$ ). Wenn Bromat verschwindet, wird  $Fe^{2+}$  gebildet. Das Ferroin wird rot. B: Brommalonat ist konzentriert genug, um  $Fe^{3+}$  zu  $Fe^{2+}$  zu reduzieren. Es entsteht Essigsäure, CO<sub>2</sub> (Gasblasen!) und Bromid, welches Reaktion A hemmt. Dadurch wird die Bildung des Brommalonats unterbunden, die Reaktion B hört auf. Nach Winfree (1980) 005/zhabotinsky-reaktion



Abbildung 1.3: Belousov-Zhabotinsky-Reaktion als Wellenmuster in einer Petrischale. Zunächst ist die Lösung rot. Durch eine Störung an einer Stelle werden Bromionen verbraucht, Bromat oxidiert  $Fe^{2+}$  zu  $Fe^{3+}$  (blau). Bromionen gelangen durch Diffussion aus der Umgebung in das oxidierte (blaue) Gebiet. Dadurch wird das bisher rote Gebiet zu einem blauen Ring. Hat Brommalonat das  $Fe^{3+}$  reduziert (Bromionen entstehen), wird das Gebiet wieder rot. Die Bilder geben die zeitliche Entwicklung wieder (Abstand 60 Sekunden). Nach Winfree (1980). 006/zhabotinsky-wellen



Abbildung 1.4: Verlauf der Glykolyse bei Hefe und Rückkopplungen von Substraten auf die Enzyme. Mit  $\sim$  sind die Stellen markiert, an denen Schwingungen entstehen.  $\rightarrow$ : Fluß. gestrichelter Pfeil: Rückkopplungspfad. +: Aktivierung, -: Hemmung. HEX: Hexokinase, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, PFK: Phosphofruktokinase, TPI: Triosephosphat-Isomerase, GAPDH: Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, ph: Phosphat, PGK: Phosphoglyzerokinase, ADH: Aldehyd-Dehydrogenase, NADP: Nicotinamid-Dinukleotid-Phosphat. Nach Chance et al. (1967), Edmunds (1988). 007a/glykolyse

sen werden (Abbildung 1.5). Je nach den Bedingungen beträgt die Periodenlänge zwischen zwei und 70 Minuten. Sie ist stark von der Temperatur abhängig. Um das Phänomen zu beob-



Abbildung 1.5: Induktion der Glykolyse-Oszillation bei einer Hefesuspension. Zum Zeitpunkt 0 (blauer Pfeil) wurde die ('ausgehungerte') Suspension mit Glukose versetzt. Das stationäre Fließgleichgewicht wird nach einem oszillatorischen Übergang erreicht. Die Fluoreszenz der NADH wurde als Zeiger der Glykolyse gemessen. Nach Antkowiak (1987). 008/glykolyseosc

achten, wird eine Hefesuspension ausgehungert (kein Zucker angeboten) und dann, wenn die NADH Fluoreszenz konstant niedrig ist, Glukose zugefügt, sodaß die Konzentration 100 mM beträgt. Danach wird KCN zugegeben. Den Zellen steht jetzt kein Sauerstoff mehr zur Verfügung. Die nun ablaufende Glykolyse verläuft bei  $20^{0}$ C zyklisch mit einer Periodenlänge von etwa einer Minute.

Die Schwingungen entstehen innerhalb eines kritischen Bereichs der Flußrate, weil dann im Reaktionsverlauf Rückkopplungen stattfinden (Abbildung 1.4). Ziel der Glykolyse ist es, ATP herzustellen. ADP steuert dabei die Aktivität der Phosphofruktokinase (PFK), indem es an einen spezifischen Rezeptor des Enzyms bindet. Dadurch ändert sich die Form des Enzyms und es arbeitet hundert mal schneller. Bei niedriger ADP-Konzentration (also hohem ATP-Gehalt) wird die Glykolyse gehemmt. Auf diese Weise entstehen die Schwingungen.

Mit Sauerstoff-Pulsen läßt sich die Phase des Glykolyse-Rhythmus verschieben. Wird der Puls mit einer bestimmten Stärke in einer kritischen Phase gegeben, verschwindet der Rhythmus. Das spricht für einen Grenzzyklus mit nur zwei Zustandsvariablen, mit denen das oszillierende System beschrieben werden kann Winfree (1972).

Die Glykolyse-Oszillationen sind auch in zellfreien Extrakten zu beobachten Hess and Boiteux (1971).

Für die zeitliche Kontrolle und Koordination von Stoffwechselvorgängen werden von Organismen auch ultradiane Uhren verwendet, die wie circadiane Uhren Temperatur-kompensiert ablaufen. Sie haben aber eine höhere Frequenz und können nicht wie diese durch äußere Zeitgeber im 24-h-Takt synchronisiert werden. Ein Beispiel sind Paramecien. Wenn man die Bewegung einzelner Pantoffeltierchen unter dem Mikroskop beobachtet, findet man Zeitabschnitte, in denen diese Einzeller längere Stücke mehr oder weniger geradeaus schwimmen und nur selten eine andere Richtung einschlagen. Nach einer gewissen Zeit ändert sich das Schwimmmuster. Jetzt werden nur kurze Stücke geradeaus zurückgelegt und häufig die Richtung gewechselt. Dieser Verhaltenswechsel zeigt Perioden von 45 Minuten. Die gleichen Perioden ergeben sich auch bei höheren und niedrigeren Temperaturen. Dieser ultradiane Rhythmus zeigt also wie der circadiane Rhythmus eine Temperaturkompensation. Das deutet auf eine Funktion als Uhr hin.

Ein weiteres Beispiel sind Hefekulturen: Sie besitzen ultradiane Uhren, die sich in rhythmischen Änderungen von Stoffwechselprodukten manifestieren. Die Sauerstoffkonzentration und der intrazelluläre pH können als Zeiger dieser Uhr benutzt werden (Satroutdinov et al. (1992), Murray et al. (2001)). Sie ähneln auch circadianen Uhren in ihrer Reaktion auf neuroaktive Verbindungen, die als Antidepressiva verwendet werden wie zum Beispiel Lithiumsalze und Monoamin-Oxidase-Hemmstoffe (Salgado et al. (2002)).

In schnell wachsenden Zellen von Saccharomyces pombe kontrolliert ebenfalls eine ultradiane Uhr verschiedene Vorgänge. So teilen sich die Zellen im 40 bis 44 Minuten-Takt (Abbildung 1.6). Dieser Rhythmus ist Temperaturkompensiert und unabhängig von der Wachstumsrate (Kippert and Lloyd (1996)). Er hält mindestens 18 Stunden ohne Dämpfung an. Das spricht für interzelluläre Kommunikation. Mit der gleichen Periode schwankt die  $CO_2$  Bildung bei gärenden (Abbildung 1.7) und auch bei atmenden Kulturen, wie auch die  $O_2$  Auf-



Abbildung 1.7:  $CO_2$  Bildung in einer gärenden Saccharomyces pombe Kultur bei 30<sup>0</sup>C nach 4 Temperatur-Zyklen von 30 Minuten 30<sup>0</sup> und 15 Minuten 26<sup>0</sup>C (nicht dargestellt). Gemessen wurde im 5 Minuten Abstand in drei verschiedenen unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden gemittelt und geglättet. Nach Kippert and Lloyd (1996). 010/sp-co2-r

nahme und die Ansäuerung des Kulturmedi-

ums. Wird die Zellteilung blockiert, laufen die anderen drei Rhythmen weiter ab. Sie sind also nicht eine direkte Folge des Zellteilungsrhythmus. Eine ultradiane Uhr scheint also auch hier eine allgemeine Kontrolle von Stoffwechselvorgängen auszuüben (Kippert and Lloyd (1996)).

Es gibt inzwischen eine ganze Reihe von Beispielen für Temperaturkompensation ultradianer Rhythmen (Übersicht Lloyd and Rossi (1992), Murray et al. (2001)).

## 1.3 Circumnutation bei Pflanzen

Pflanzen reagieren sehr empfindlich auf die Schwerkraft, um adäquat zu wachsen und sich im Raum richtig zu orientieren (Gradmann (1971), Johnsson (1971)). Wenn Pflanzen in die Höhe wachsen, findet jedoch die Streckung in der Regel nicht gleichzeitig über den Querschnitt verteilt statt. Stattdessen wandert die Wachstumszone über den Querschnitt. Das führt, von oben betrachtet, zu kreisförmigen, elliptischen oder pendelnden Bewegungen der jeweiligen Organspitze. Von der Seite gesehen beschreibt die Organspitze eine Helix. Bei Ranken und Winden sind diese Circumnutationen besonders ausgeprägt. Die Pflanzen suchen damit nach einem Halt. Circumnutationen sind weit verbreitet und bei windenden und nichtwindenden Dicotyledonen, Monokotyledonen, Gymnospermen und sogar bei Pilzen und Bakterien bekannt. Auch Wurzeln können Nutationsbewegungen zeigen ('root waving' Samuelsson et al. (1983)). Übersichten geben Baillaud (1962a), Johnsson (1979), Brown (1993).

Circumnutationen sind immer mit Wachstum korreliert. Unterhalb einer Wachstumsrate von 0.5 mm/h findet bei *Periploca graeca* keine Circumnutation statt (Melin (1975)). Die Periodenlänge der Circumnutation ist von der



Abbildung 1.6: Zellteilung in Saccharomyces pombe Kulturen. Sie wurden zunächst durch Temperaturzyklen von 30 Minuten 33<sup>0</sup> (rote Balken auf x-Achse) und 15 Minuten 27<sup>0</sup> ((rote Striche auf x-Achse) synchronisiert. Danach wurden die Kulturen in konstante Temperatur-Bedingungen von 26<sup>0</sup>, 30<sup>0</sup> und 34<sup>0</sup>C überführt. Der Septum-Index wurde bestimmt als Prozentsatz der Zellen, die eine Querwand bilden. Die zugehörigen Zeitreihen-Analysen mit Maximum-Entropie-Spektral-Analyse (MESA) sind rechts neben den Kurven dargestellt (Spektraldichte gegen Periodenlänge). Sie zeigen bei allen drei Temperaturen die gleiche Periodenlänge von etwas über 40 Minuten. Nach Kippert and Lloyd (1995). 009/s-pombe-zt

Temperatur abhängig. Je nach Objekt liegt sie in der Regel zwischen 15 Minuten und 5 h. Einige Arten besitzen Circumnutationen mit verschiedenen Frequenzen (Sicyos, Passiflora: Gradmann (1922), Phaseolus: Heathcote (1966), Arabidopsis: Schuster and Engelmann (1997)). Die Auslenkungen sind bei Arabidopsis nur Bruchteile von mm, bei Hoya carnosa dagegen bis zu 1.5 m. Es gibt je nach Art und Schwingung spezifische Vorzugsrichtungen nach rechts oder links ('Chiralität'). Schwingungen mit verschiedenen Perioden können sich überlagern.

Das Hypokotyl von weist ein ganzes Spektrum von Circumnutationen auf kurzperiodischen und langperiodischen Nutationen. Die zugrunde liegenden Mechanismen werden im Kapitel 20, page 419 näher besprochen.

Das Wachstum des Hypokotyls von Arabidopsis thaliana steht ferner unter circadianer Kontrolle, wie sich unter konstanten Bedingungen zeigt. Es gibt Zeitabschnitte mit geringem Wachstum und solche mit starkem Wachstum. Da ultradiane Circumnutationen nur während des Wachstums auftreten, müssen sie notwendigerweise durch den circadianen Rhythmus moduliert werden. Bei Arabidopsis gibt es weitere Vorgänge, die circadian kontrolliert werden (Millar (1999)).

Wachstum und Circumnutationen von Arabidopsis thaliana (und anderen Pflanzen) können mit Hilfe von Bildanalyse-Verfahren registriert werden.

Zahlreiche andere Pflanzen zeigen Circumnutationen. Gut untersucht sind zum Beispiel die Pendelbewegungen von im Dunkeln gewachsenen Sonnenblumenkeimlingen.

#### **1.4 Gravitropes Pendel**

Sowohl die Fähigkeit von Pflanzen, sich wieder aufzurichten, wenn sie zum Beispiel durch Sturm umgekippt wurden, als auch das Ranken und Winden bei Pflanzen ist lange bekannt (Mohl (1827)). Darwin and Darwin (1880) wiesen darauf hin, wie allgemein Circumnutationen auch bei nichtwindenden Pflanzen verbreitet sind. Linné führte den Begriff Circumnutationen ein. Heute wird das gesamte Spektrum der ungleichmäßigen Wachstumsbewegungen, also kreisförmige, elliptische und pendelförmige, als Circumnutation bezeichnet (Israelsson and Johnsson (1967)).

Werden Sonnenblumensamen im Dunklen oder im Rotlicht (physiologisches Dunkel) zum Keimen gebracht und wartet man, bis das Hypokotyl etwa 5 bis 6 cm lang ist, kann man durch Kippen der Keimlinge um  $90^0$  für beispielsweise 30 Minuten eine gravitrope Pendelbewegung induzieren (Engelmann (1999)). Bringt man die Pflanzen wieder in die vertikale Stellung, krümmt sich die Spitze auf Grund der Reizung in die Gegenrichtung zur Schwerkraft. Nach maximaler Krümmung setzt eine Gegenbewegung in die andere Richtung ein. Diese Pendelbewegung hält einige Zeit an (Abbildung 1.8). Sie wird sogar stärker, wenn das Hypokotyl sich in physiologischer Dunkelheit weiter streckt. Schließlich kann der stark etiolierte Stengel sogar umkippen.

## 1.4.1 Physiologie des Gravitropismus

Neuere Zusammenfassungen zur Physiologie des Gravitropismus finden sich bei Salisbury and Ross (1991), Taiz and Zeiger (1998), Hangartner (1997). Es wird zwischen Ortho- (in der Schwerkraftrichtung), Dia- (quer zur Schwerkraftachse), Plagio- (schräg nach unten) und



Abbildung 1.8: Ein Sonnenblumenkeimling wird für 30 Minuten waagerecht gelegt (0) und dann wieder aufgerichtet (1). Der Schwerkraftreiz (roter Pfeil nach unten) führt nach einer gewissen Zeit zu einer Reaktion: Die Spitze des Keimlings krümmt sich (2) und noch stärker (3). In diesem Zustand maximaler Krümmung fehlt aber das hormonelle Ungleichgewicht der beiden Seiten. Ein neuer Schwerkraftreiz reizt das Hypokotyl erneut. Es krümmt sich jetzt nach der Gegenseite (4), schießt über die Senkrechte hinaus (5) und krümmt sich zur anderen Seite (6), bis erneut eine Schwerkraftreizung erfolgt (7) mit Gegenreaktion (8). Die Pfeile geben die Krümmungsrichtungen an. Nach Engelmann and Johnsson (1998). E016q/pendel

Agravitropismus (gegen die Schwerkraft) unterschieden. Wurzeln wachsen in die Richtung der Schwerkraft oder schräg zu ihr. Die Wurzelkappe perzipiert den Schwerkraftreiz. Sprosse wachsen negativ gravitrop.

Pflanzenorgane können sehr empfindlich auf Schwerkraft reagieren. Eine Reizdauer von 0.7 Sekunden genügt bereits (Sievers (1990)). Es gibt verschiedene Hypothesen, um zu erklären, wie die Schwerkraft zu einer physiologischen reaktion führt (Salisbury and Ross (1991), Taiz and Zeiger (1998)). Nach der Statolithentheorie sind spezifische Zellen, die Statozyten, für die Perzeption des Schwerkraftreizes verantwortlich. Sie besitzen Amyloplasten mit Stärkekörnern oder Vesikel mit BaSO<sub>4</sub> (*Chara*) ('Statolithen'). Für die Theorie sprechen eine Reihe von Argumenten, die für diese Hypothese sprechen (Sievers et al. (1996)). Ohne Stärke sollte es keinen Gravitropismus geben können. Jedoch zeigen auch stärkefreie Mutanten von Arabidopsis thaliana noch Reaktionen (Caspar and Pickard (1989)). Amyloplasten können jedoch auch ohne Stärkekörner noch wirken (Kiss et al. (1989)). Entscheidend ist dabei die Dichte. Sie beträgt für Stärke 1.3, gegenüber 1.0 von Cytosol und Kern. Auch die Größe ist wichtig. Zu kleine und zu leichte Partikel zeigen Brownsche Bewegung und eignen sich nicht als Schwerkraft-Rezeptoren.

Eine Alternative zur Statolithentheorie wurde von Pickard and Ding (1993) vorgeschlagen. In diesem 'Plasmalemma zentral kontrollierten Modell´ sind Calcium-Kanäle, die durch Zug-Kräfte aktiviert werden, um Zentren herum angeordnet, in denen Zytoskelett und Zellwand verbunden werden. Die Kanäle öffnen sich als Reaktion auf Zugspannungen des Protoplasten, des Zytoskeletts oder der Zellwand an der Membran. Die Zugspannung wird durch die Schwerkraft induziert.

Der gravitrope Reiz muß nach der Perzeption in ein Signal umgewandelt werden, um zu einer differentiellen Wachstumsreaktion zu führen. Eine laterale Umverteilung von Auxin durch die Schwerkraftreizung (Cholodny (1926), Went (1926)) oder Anderungen in der Empfindlichkeit auf Auxin (Salisbury et al. (1988), Evans (1991)) könnten zu dieser Reaktion führen. Gravitrope Experiment an Koleoptilgn von Edel (2001) sprechen für ein anderes Modell: Wird eine Koleoptile horizontal gelegt, wird ein Faktor auf der unteren Seite abgegeben, der die Zellwände aufweicht, während dieser Faktor auf der oberen Seite von den zellen zurückgehalten wird. Dadurch krümmt sich die Koleptile nach oben.

Je nach positiver (zum Beispiel in den Wurzeln) oder negativer gravitropischer Reaktion (zum Beispiel in den Sprossen) wächst die Unterseite oder Oberseite des reagierenden Organs stärker.

## 1.4.2 Messen der Bewegungen und Analyse

Die Pendelbewegung läßt sich mit einem Bildanalysesystem messen (Engelmann (1999)). Während und nach der Registrierung kann die Bewegung in einem Zeitdiagramm dargestellt werden (Abbildung 1.9). Mit Zeitreihen-Analyseverfahren (siehe Abschnitt 20.23) kann die Periodenlänge dieser Schwingung bestimmt werden.

#### 1.4.3 Exogen oder endogen?

Die Bewegung kann mit einem Rückkopplungsmodell beschrieben werden (Johnsson in Johnsson (1977) und Abbildung 1.10).

Um zu entscheiden, ob es sich um eine exogene oder endogene Schwingung handelt, wur-



Abbildung 1.9: Zeitlicher Verlauf des gravitropen Pendels eines Sonnenblumenkeimlings, wie er in Abbildung 1.8 dargestellt ist. Zur Zeit 0 wurde der Keimling einem Schwerkraftreiz ausgesetzt, indem der Topf für eine Stunde um  $90^0$  auf die Seite gelegt wurde. Nachdem das Gefäss wieder in seine ursprüngliche Lage gebracht war, wurden Pendel-artige Bewegungen beobachtet. 016AX/pendel-plot

de ein Versuch durchgeführt, der in Abbildung 1.11 abgebildet ist (Johnsson in Engelmann and Klemke (1983)). Das Ergebnis dieses Experiments läßt vermuten, daß die Pendelbewegung der Sonnenblumenkeimlinge tatsächlich exogener Natur ist. Eine Auslenkung von der Lotrechten führt zu einer gravitropen Reizung, die das Hypokotyl auf der gravitrop gereizten Seite wachsen läßt. Dadurch findet auf der Gegenseite eine neue gravitrope Reizung statt, die nach einiger Zeit wieder zu einer Krümmung des Hypokotyls in die andere Richtung führt. So kommt die Pendelbewegung zustande.

Nun zeigten sich aber bei Versuchen unter sehr geringen Schwerkräften in einer Raumfähre, daß trotzdem noch Krümmungsreaktionen auftraten (Brown (1993)). Sie deuten auf einen endogenen Oszillator hin, der zu ungleichem, aber koordiniertem Wachstum führt. Solche Bewegungen sind schon seit langem als Circumnutationen bekannt und im vorausgegangenen Ab-



Abbildung 1.10: Rückkopplungsmodell des gravitropen Pendels. Ein Sollwert ('senkrecht wachsen'  $\alpha_{ref}$ ) wird mit dem Ist-Wert  $\alpha(t)$  verglichen. Wenn sich die beiden Werte unterscheiden, entsteht ein Fehlersignal e(t). Es wird durch ein tropistisches System verstärkt und gewichtet und zeitverzögert wieder mit dem Sollwert verglichen. Rechts ist der augenblickliche Winkel a(t)erklärt als Abweichung von der Lotrechten. Nach Johnsson (1977). E017v/rkm

schnitt besprochen worden. Eine Re-Analyse der Daten des Experiments im Weltraum zeigte, daß diese Bewegungen aus Oszillationen mit verschiedenen Periodenlängen zusammengesetzt sind (Bardal et al. (2001)).

## 1.5 Transpirationsrhythmen beim Hafer

Wasser ist für alle Lebewesen extrem wichtig. Die Zellen und Gewebe haben einen hohen Wassergehalt, und alle biochemischen Reaktionen verlaufen im wässrigen Milieu. Pflanzen in trockener Umwelt schützen sich deshalb durch eine wasserundurchlässige Cuticula gegen Wasserverlust. Andererseits brauchen Pflanzen  $CO_2$  zur Synthese von Kohlenhydraten.

Deshalb wurden im Laufe der Evolution Spaltöffnungen 'erfunden'. Sie können je nach den äußeren und inneren Bedingungen den Wassergehalt und den Luftaustausch aktiv regeln. Zusätzlich spielen sie auch bei der Temperaturregulation eine Rolle. Durch Verdunstungskälte können zu hohe Temperaturen vermieden werden. Ausserdem wird Transpiration benötigt, um Minaeralstoffe während der Wasseraufnahme aus dem Boden aufzunehmen (obwohl das nicht essentiell ist).

Die Transpiration ist also ein Vorgang, bei dem die Stomata durch komplizierte Regelmechanismen geöffnet und geschlossen werden (Abbildung 1.12). Die Mechanik, Kontrolle und Physiologie der Stomata-Bewegung sind gut untersucht (siehe Lehrbücher der Pflanzenphysiologie wie zum Beispiel Salisbury and Ross (1991)). Stomata öffnen sich, wenn Wasser aufgenommen wird. Ursache dafür ist eine K<sup>+</sup>-Akkumulation in den Schliesszellen. Ihr osmotisches Potential wird dadurch negativer. Licht bewirkt, das K<sup>+</sup> in die Schliesszellen einströmt, wodurch sich die Schliesszellen öffnen. Dunkelheit verursacht, dass sich die Schliesszellen schliessen. K<sup>+</sup> wird von den benachbarten Epidermiszellen geliefert. Es wird nicht einfach hineingepumpt, sondern gegen H<sup>+</sup> ausgetauscht. H<sup>+</sup> stammt von organischen Säuren,



Abbildung 1.11: Die gravitrope Pendelbewegung von Sonnenblumenkeimlingen wurde mit einer Kompensationsmethode registriert. Eine Drahtschlaufe wird über die Schnecke eines Stufenmotors und ein Zahnrad so bewegt, daß sie der Bewegungstendenz der Spitze entgegenwirkt. Zwei Leuchtdioden registrieren die kleinste Abweichung von der Lotrechten und melden diese über einen Komparator (Wheatstone-Brücke und Verstärker) an den Motor weiter. Dieser hält über die Drahtschlaufe das Hypokotyl immer senkrecht. Ein Drehpotentiometer gibt die Drehungen des Motors zur Kompensation der Bewegungstendenzen an einen Spannungsschreiber weiter. Wenn die Pendelbewegung von einem endogenen Oszillator verursacht wird, müßte die Tendenz des Keimlings, zu schwingen, mit dieser Methode meßbar sein. Die registrierte Kurve zeigt aber keine Tendenzen zum Schwingen, wenn das Hypokotyl senkrecht gehalten wird. Also ist die Pendelbewegung exogen verursacht. Nach Johnsson in Engelmann and Klemke (1983). E018/nullmethode

hauptsächlich Malonsäure. Stärke und andere Kohlenhydrate in den Schiesszellen werden für die Malatproduktion verwendet. Auch durch zunehmende Konzentrationen organischer Säuren wird das osmotische Potential stärker negativ (siehe Zeiger et al. (1987)).

Abscissinsäure wird bei Wasserstress (beispielsweise der Wurzeln) produziert und schliesst die Stomata, indem der Zellturgor erniedrigt wird.

Mindestens zwei Rückkopplungskreise kontrollieren die Bewegung der Schliesszellen (siehe Abbildung 1.12). Wenn der  $CO_2$ -Gehalt in den Interzellularen des Blattgewebes und damit auch in den Schliesszellen abnimmt, dringt  $K^+$  ein und die Stomata öffnen sich. CO<sub>2</sub> kann eindiffundieren und für die Photosynthese benutzt werden. Das ist der erste Rückkopplungskreis. Der zweite Rückkopplungskreis zeigt sich unter Wasserstress: ABA wird gebildet und die Stomata schliessen sich. Auf diese Weise wird die Pflanze gegen übermässigen Wasserverlust geschützt. Beide Rückkopplungskreis interagieren miteinander. So wird den Stomata die Aufgabe zugewiesen, der Pflanze in ihrem Dilemma zwischen Verdursten und Verhungern beizustehen (Raschke (1976)).

Es gibt verschiedene Stomata-Typen. In Abbildung 1.13 ist der Gramineen-Typ beim Hafer gezeigt. Er besteht aus zwei Schließzellen, die Hantel-artig angeordnet sind und die Spalte je nach dem Schwellungsgrad öffnen oder schließen. Um die Bewegung der verschiedenen Stomata zu sehen, gibt es Filme (zum Beispiel Trolldenier (1967)). Viele Pflanzen zeigen Rhythmen in ihrem Wasserregulationssystem. Das äußert sich beispielsweise in einer periodischen Wasserabgabe der Pflanzen über ihre Spaltöffnungen (Transpiration). Es sind ultradiane und circadiane Transpirationsrhythmen bekannt. Mit einer geigneten Vorrichtung lassen sich die Transpirationsrhythmen zum Beispiel bei den Primärblättern des Hafers regis-



Abbildung 1.13: Spaltöffnung eines Haferblattes mit hantelförmigen Schließzellen und nierenförmigen Nebenzellen. Spaltöffnung (Mitte) geschlossen unter Bedingungen, bei denen die Blasen-förmigen Enden geschrumpft sind und deshalb die mit ihnen verbundenen stark verdickten Zellwände sich berühren (links). Wenn die Blasen-förmigen Enden schwellen, rücken die verdickten Wände auseinander und die Stomata öffnen sich (rechts). Nacheiner elektronenmikroskopischen Aufnahme von Palevitz (1981). 020/hafer-stomata



Abbildung 1.12: Der obere Teil zeigt einen schematischen Querschnitt durch das Blattgewebe und die Wirkung des Lichtes auf den Gasaustausch. Der untere Teil zeigt, wie Umweltbedingungen die  $CO_2$ -Aufnahme, die Transpiration und die verschiedenen Rückkopplungskreise beeinflussen. Die Öffnungsweite der Stomata und damit die Transpiration wird durch mehrere Faktoren über den Ionentransport in den Schließzellen geregelt: Durch Licht direkt (blaue Wellenlängenbereiche) und über Chlorophyll (Chl) des Schwamm- und Pallisadenparenchyms indirekt. Verschiedene Rückkopplungskreise beeinflussen die Stomata: Eine direkte hydropassive Rückkopplung RK<sub>hp</sub> vom Gewebewasser. Ferner eine hydroaktive Rückkopplung RK<sub>ha</sub>, vom Gewebewasser über einen Sensor des Wasserpotentials  $\Psi$ . Bei Wassermangel (niedriges  $\Psi$ ) wird Abscissinsäure (ABA) gebildet und wirkt auf den Ionentransport so, daß die Stomata sich schließen. Schließlich gibt es noch eine photoaktive Rückkopplung RK<sub>ha</sub>', die von einem CO<sub>2</sub>-Sensor gesteuert wird. Nach xx. E019A/regel-trans



Abbildung 1.14: Transpiration des Hafer-Primärblattes. Oben: Messapparatur. Haferkeimlinge mit Wurzelwerk in Wassergefäß. Eine Pumpe leitet trockene Luft (trockenes Silikagel in Waschflasche) durch einen Schwebekörper-Durchflußmesser über das Primärblatt in einer Küvette. Die Luft feuchtet sich durch die Transpiration an und streicht an einem Feuchtesensor (ganz rechts) vorbei. Dieser erzeugt eine Spannung, die vom Feuchtegrad abhängt. Sie kann mit einem Schreiber oder über einen Rechner aufgezeichnet werden. Unten: Verlauf der Transpiration. Periodenlänge bei  $27^{0}$ C etwa 30 Minuten. D021/transpir-messen



Abbildung 1.15: Rückkopplungs-Modell der Transpirationsschwingungen nach Johnsson (1983): Der normale Wasserzustandswert wird mit dem tatsächlichen Wasserzustand verglichen. Unterscheiden sich die beiden Werte, wird die Abweichung ('Störgröße') als Signal weitergeleitet und führt je nach Vorzeichen zum Öffnen oder Schließen der Stomata. Dabei wird zunächst der Wassergehalt der Nebenzellen und mit einiger Verzögerung der Wassergehalt der Schließzellen verändert. Durch die Stomata wird die Transpiration bestimmt, die zusammen mit der Wasseraufnahme durch die Wurzeln den Wasserzustand in der Pflanze regelt. E022v/transpir-modell

trieren (Abbildung 1.14). Die Schwingungen können mit einem Rückkopplungsmodell beschrieben werden (Abbildung 1.15).

Um über die zugrundeliegenden Mechanismen mehr zu erfahren, wurde versucht, durch Substanzen die Periodenlänge, also den Oszillator, zu beeinflussen. Theophyllin verlangsamt den Rhythmus schon bei sehr geringen Konzentrationen. Auch schweres Wasser,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{La}^{3+}$  verlangsamen den Rhythmus (Brogardh and Johnsson (1974b), Brogardh and Johnsson (1974a), Brogardh and Johnsson (1975a)).

Die Wasseraufnahme der Wurzeln ist nicht für den Transpirationsrhythmus verantwortlich, da er auch bei Hafer mit abgeschnittenem Wurzelsystem auftritt. Es ist aber ein großer Widerstand nötig. Im Fall des Hafers kann er durch eine Klemme erzeugt werden, mit der das Xylem nach dem Abschneiden des Wurzelsystems zusammengepreßt wird. Valinomycin bringt in abgeschnittenen Haferblättern den Transpirationsrhythmus wieder in Gang (Hellgren et al. (1976)). Entweder geschieht das, weil der Widerstand erhöht wird, oder weil die Substanz die K<sup>+</sup>-Permeabilität erhöht.

Es gibt übrigens auch *circadiane* Transpirationsrhythmen. Sie sind bisher erst bei wenigen Pflanzen beschrieben worden (Übersicht bei Barrs (1971), Hopmans (1971) and Webb (1998), siehe Tabelle **??**). Möglicherweise sind diese aber weiter verbreitet, als bekannt. Wir fanden solche Rhythmen bei *Arabidopsis* und Tabak (unveröffentlicht, siehe auch Webb (1998)).

## 1.6 Seitenfiederbewegung des Automobile *Desmodium*

'Die Natur wirkt nach ewigen, notwendigen, dergestalt göttlichen Gesetzen, ..... Man bedenke, wie eine Naturerscheinung, die auf Verstand, Vernunft, ja auch nur auf Willkür deutet, uns Erstaunen, ja Entsetzen bringt. ..... Noch höher steigt jene Empfindung, der ich keinen Namen geben will, bei Betrachtung des Hedysarum gyrans<sup>2</sup>, das seine Blättchen. ohne sichtlich äußere Veranlassung, auf und nieder senkt und mit sich selbst, wie mit unseren Begriffen, zu spielen scheint. Denke man sich einen  $Pisanq^3$ , dem diese Gabe zugeteilt wäre, so daß er die ungeheuren Blätterschirme für sich selbst wechselweise niedersenkte und aufhübe, jedermann, der es zum ersten Male sähe, würde vor Entsetzen zurücktreten.' (Goethe (1968))

Die kreisenden Bewegungen der Seitenfiederblättchen von *Desmodium gyrans* (*Fabaceae*) haben ihr den Namen 'Indische Telegrafenpflanze' eingebracht. In Indien, ihrer Heimat, wird sie Bon Charal ('forest churl', Tanzen zum Klatschen der Hände) genannt. Der französische Name 'Automobile' ist weniger poetisch, aber genauso treffend.

Ein Blatt besteht aus einem größeren Endfieder und zwei Seitenfiedern (eins oder beide können auch fehlen). Während die Endfieder eine tagesperiodische Bewegung zeigen (tags horizontal, nachts nach unten hängend), bewegen sich die Seitenfieder mit Perioden im Minutenbereich rhythmisch auf und ab (Abbildung 1.16).

 $<sup>^2{\</sup>rm fr{\ddot{u}}herer}$ Name für Desmodium gyrans  $^3{\rm Banane}$ 

Tabelle 1.1. I halizen int ch cautaller Konstolle der Transpiration												
Pflanzenart	bedingungen	Period in Stunden	Referenz									
Arabidopsis thaliana	LD und LL	24 bzw. 23	Engelmann and Johnsson (1998)									
Arabidopsis thaliana	LD und LL	24	Webb (1998)									
Avena sative		26	Brogardh and Johnsson (1975b)									
Arachis		26	Pallas et al. (1974)									
	DD		Hennessey et al. $(1993)$									
Oxyria digyna	LL	24	Haapala $(1967)$									
Phaseolus vulgaris	DD,LL,DD	24,25.7, gedämpft	Hopmans $(1971)$									
Phaseolus vulgaris	DD		Holmes and Klein (1986)									
Stellaria media	LL	23	Haapala (1967)									
Tamarix aphylla			Hagemeyer and Waisel (1987)									
Tradescantia virginiana	LL,DD	23.1, gedämpft	Martin and Meidner (1971)									
Triticum aestivum			Meidner and Mansfield (1965)									
			Meidner and Mansfield (1968)									
Vicia faba	LL	22	Stalfelt (1963)									
Vicia faba	DD	22	Gorton et al. (1989)									
Xanthium pennsylvanicum	DD	24	Mansfield and Heath (1961)									
Zea mays			Karve and Mishal (1966)									

Tabelle 1.1: Pflanzen mit circadianer Kontrolle der Transpiration



Abbildung 1.16: Endfieder (oben) und Seitenfieder (darunter) von *Desmodium gyrans* und ihre rhythmischen aufwärts- und abwärts-Bewegungen. Die obere Kurve gibt die circadiane Bewegung des Endfieders wieder (Abszisse: Tage). Die untere Kurve zeigt die ultradiane Bewegung eines Seitenfieders (Abszisse: Minuten). D023n/desmodium-fieder-bewegung

Die Bewegungen beruhen auf Volumenänderungen von Motorzellen in speziellen Gelenken, den Pulvini (Abbildung 1.16). Ihre Struktur zeigt Abbildung 1.17. Ein zentraler Zylinder enthält die Leit- und Stützelemente. Die Motorzellen liegen außerhalb des zentralen Zylinders.



Abbildung 1.17: Querschnitt (rechts) und Längsschnitt (links) durch den Pulvinus eines Seitenfieders von *Desmodium gyrans*. Von außen nach innen: Epidermis, Motorgewebe, Zentralzylinder. Nach Engelmann and Antkowiak (1998)). 024/anatomie-pulvinus-desmo

Würden die Leit- und Stützelemente außen liegen, wie es normalerweise bei Stengeln und Blattstielen der Fall ist, könnte sich das Gewebe nicht krümmen.

Das Krümmen und Aufrichten der Gelenke beruht auf einem alternierenden Schrumpfen und Schwellen der Motorzellen. In diesen Zellen sind Zellulose-Mikrifrobrillen ringförmig angeordnet. Dadurch können sich die Motorzellen nur ausdehnen und verkürzen, aber nicht dicker werden (Abbildung 1.18). Elektrophysiologische Untersuchungen und Behandlungen mit Hemmstoffen haben zu folgendem Modell der Längenänderungen in den Motorzellen geführt (Abbildung 1.19): shrinked

		Т	Т	1	1	1	1	Т	T	Т	1	-	-	-	-	1	1
L î	- i	÷.	÷.	÷.	÷.	÷.	i.	÷.	÷.	÷.	÷.	÷	÷.	÷.	÷.	÷.	i i
l i	-i	÷.	÷.	÷.	i.	÷.	i.	i.	i	i.	÷.	i.	i.	÷.	i.	÷.	i i
1				1	1	1	1	1		1	1	÷.	÷.	÷.	÷.	1	1
	_ <u>I</u>	1	1	1		1	1					1	1	1	1	1	
11	_ <u>I</u>	1	1	1		1	1			1		1	1	1	1	1	
	- !		1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1
	- !		1	÷.	1	÷.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	÷.	
	- 1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	- 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	÷.	1	1	
1	- 1	1	4	4	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	
1 8	- 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	- 8	1	÷	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1	4	1	4	
				1		1	1	1		1	1			1	1	1	

swollen

_	-	_	_	_															-
											- L	- L -					- L.	- L	
	1	1	1			1	1	1	1	1			1	1	1	1	1		
	1		1		1	1	1	1	1	1	1	1	- İ -	- i -	- i -	- i -	1	1	
	1	1	1	1	1	- È	1	1	- i -	1	- İ -	- È	- i	- i	i.	i.	1	1	
	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	- i -	- î	- i -	- i -	1	1	
	1	1	1	1	- î -	- î	- î	- i	- î	- i	- İ	- È-	i	i	i.	i.	- i	- i	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-i-	- i	-i-	i.	1	1	
	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	- î -	- î	- i -	- i -	1	1	
	1	1	1	1	- i -	- Î	- i	- i	- È	- i	- İ	- È-	- i	i	i.	i.	- È	- i	
	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	-i-	- i	- i -	- i	1	1	
	1	1	1	1	- i -	- î	- í	- i	- î	- i	- İ	- È-	- i	- i	-i-	-i-	- i	- i	
	L.	1	1	1	1	- È	1	1	1	1	- İ -	- İ	- i	- i	i.	i.	1	1	
	Į.	1	1	1	1	-9	<u>۱</u>	1	1	- Į.	1	1	į.	į.	÷.	÷.	1	1	
						1													
						1													

cellulose-microfibrills

Abbildung 1.18: Anordnung der Zellulose-Mikrofibrillen in einer Motorzelle des Pulvinus vom Seitenfieder von *Desmodium gyrans*. Oben im geschrumpften, unten im geschwollenen Zustand. Die Längsachse der Zelle entspricht der Längsachse des Gelenkes. 025v/fibrillenpulvinus

Protonenpumpen im Plasmalemma pumpen H<sup>+</sup> nach außen. Dadurch entsteht im Cytoplasma der Zelle eine negative Ladung, die K<sup>+</sup> in die Zelle fließen läßt. Durch einen H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> Symport gelangt ferner  $Cl^-$  in die Zelle. Diese osmotisch wirkenden Ionen lassen Wasser einströmen: Die Zelle schwillt. Wenn die Zellwand durch das Schwellen einem bestimmten Druck ausgesetzt ist, werden vermutlich durch 'stretch activated channels' Spannungsabhängige  $Ca^{2+}$  Kanäle geöffnet.  $Cl^{-}$  und  $K^{+}$ fließen aus, Wasser verläßt die Zelle und sie schrumpfen. Dann wiederholt sich der Vorgang: Die Protonenpumpen hyperpolarisieren die Zelle wieder. Der Rhythmus und seine Periode wird durch die Zeitkonstanten bestimmt, die diesen Vorgängen zugrunde liegen. Bei höherer Temperatur verkürzt sich die Periode der Schwingungen.

Solche Rhythmen im Minutenbereich scheinen



Abbildung 1.19: Modell des Schrumpfens und Schwellens von Motorzellen im Seitenfiedergelenk von *Desmodium gyrans*. Links: Die Motorzelle schwillt (unteres Bild links), weil sie  $K^+$  und  $Cl^-$ aufnimmt und als Folge davon Wasser einströmt (treibende Kraft: Protonenpumpen, die  $H^+$  nach außen abgeben und damit im Zellinneren ein negatives Membranpotential erzeugen). Rechts: Die Motorzelle schrumpft, weil das Membranpotential zusammenbricht und dadurch  $K^+$  und  $Cl^-$  die Zelle verlassen. Als Folge davon strömt Wasser aus (unteres Bild rechts). Nach Engelmann and Antkowiak (1998). E026B/desmodium-model

bei Pflanzen weiter verbreitet zu sein als bisher bekannt ist (Engelmann (1996)). Sie hängen möglicherweise mit dem Wechsel der Pflanzenzelle zwischen einem Pump-Stadium und dem Ausströmen von Ionen aus den Zellen zusammen (Gradmann and Buschmann (1996)).

## 1.7 REM-Schlaf der Säuger

Ein weiteres Beispiel für einen ultradianen Rhythmus ist der REM-Schlaf der Säuger (und Vögel). Er soll hier kurz besprochen werden. Im nächsten Abschnitt (??) wird der Schlaf-Wach-Rhythmus des Menschen ausführlicher behandelt. Eine gute und ausführliche Übersicht über den Schlaf gibt es auf einer CD von A. Borbely et al. (1999), Zürich.

Der Schlaf des Menschen wird durch verschiedene Schlafstadien strukturiert. Er besteht aus unterschiedlich tiefen SWS-Stadien<sup>4</sup> und aus dem REM<sup>5</sup>-Schlaf. Beim Einschlafen dauert es etwa 30 bis 45 Minuten, um vom Wachzustand in das tiefste Stadium des SWS zu gelangen. Dann läuft der Prozeß umgekehrt ab: vom tiefsten bis zum flachsten Stadium. Auch das dauert etwa 30 bis 45 Minuten. Allerdings wacht man dann noch nicht auf. Stattdessen beginnt der REM-Schlaf. Dieser REM-Schlaf-Zyklus wiederholt sich alle 90 bis 120 Minuten im Schlaf und ist damit ein ultradianer Rhythmus. Er ist möglicherweise ein Teil des 'basic rest activity cycle' (Kleitman (1963)).

Der REM-Schlaf wurde von Aserinsky and Kleitman (1953) entdeckt, als sie den Schlaf von Säuglingen untersuchten. Ihnen fielen in bestimmten Stadien des Schlafes rollende Bewegungen des Augapfels unter den geschlossenen Lidern auf. Beim Registrieren der Hirnströme im EEG entdeckten sie dabei Regelmäßigkeiten, die in der Abbildung 1.20 dargestellt sind.

Alle 60 min treten beim Säugling solche 'raschen Augenbewegungen' auf. Beim Erwachsenen sind die Perioden länger. In diesem Schlafstadium gibt es folgende Besonderheiten:

- Das EEG des Cortex ist weniger synchron als im SWS, die Spannungen geringer, das EEG Muster ähnelt dem des Wachzustandes.
- Das EEG des Hippocampus zeigt dagegen hochsynchronisierte Theta-Wellen (4-10Hz). Solche Thetawellen gibt es auch im Wachzustand, vor allem, wenn das EEG des Neocortex maximal desynchronisiert ist.
- Der Muskeltonus ist niedrig. Ausnahmen sind die Muskeln der Augen, des Mittelohr -Knöchelchens und der Atmung.
- Die Homöostase wird durch Hemmung der sympathischen Aktivität aufgegeben. Die Körpertempertur gleicht sich der Temperatur der Umgebung an.
- Es treten langsame, rollende und gelegentlich rasche Augenbewegungen auf (Dement and Kleitman (1957)). Sie werden durch phasisch auftretende elektrische Aktivitäten im Hirnstamm, Thalamus und visuellen und auditorischen Cortex getrieben, sogenannte PGO-spikes (pontingeniculat-occipital). Diese sind die Schrittmacher für REM.
- Die Weckschwelle ist hoch (insofern ist der REM-Schlaf der tiefste Schlaf), aber das spontane Erwachen erfolgt leicht (insofern ist der REM-Schlaf der flachste Schlaf). 74-95% der Schläfer erinnern sich an Träume, während es im SWS-Schlaf nur 0-51%

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Slow Wave Sleep 1-4

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>REM= rapid eye movements, siehe später



Abbildung 1.20: Elektroencephalogramm-Muster des Menschen in verschiedenen Schlafstadien (1-4, REM-Schlaf) und im Wachzustand (linker Teil der Abbildung). Rechter Teil der Abbildung zeigt die zeitliche Folge der SWS und REM Muster während des Schlafes. Nach Kelly (1991b). D027n1/schlaf-eeg

sind (Definition der Träume bei den verschiedenen Untersuchungen unterschiedlich, daher die große Streuung).

• Im Laufe des Schlafes werden 4 bis 6 mal diese Wechsel zwischen SWS- und REM-Schlaf durchlaufen. Dabei werden die REM-Episoden länger und die Zwischenräume zwischen ihnen kürzer. Der REM-Schlaf macht bei jungen Erwachsenen etwa 25% des Schlafes aus, SWS 2 etwa die Hälfte. Die Stadien 3 und 4 treten vor allem in der ersten Hälfte, die flacheren Stadien und die längeren REM Stadien in der zweiten Hälfte der Nacht auf. Daher erwacht man in der Regel am Morgen.

Ein Räuber-Beute-Modell wurde von Hobson and McCarley (1977) vorgeschlagen, das den REM-Schlaf simuliert. Ausgänge der Hirnregion FTG sollen stimulierend auf den *Locus coeruleus* (Lc) und auf sich selbst wirken. Acetylcholin dient dabei als Neurotransmitter. Lc wiederum beeinflußt das FTG und hemmt sich selbst durch Noradrenalin. Spätere Untersuchungen bezweifeln jedoch, daß dieses Modell richtig ist (Siegel and McGinty (1977)).

Zur biologischen Bedeutung des REM-Schlafes siehe Abschnitt 20.2 unter 'Spezielle Themen'.

## 1.8 Ultradiane und circadiane Rhythmen

Mögliche Zusammenhänge zwischen ultradianen und circadianen Rhythmen wurden von verschiedenen Autoren diskutiert (mehrere Beiträge in Lloyd and Rossi (1992)). Nach Dowse and Ringo (1992) werden circadiane Rhythmen durch ultradiane *Drosophila* hervorgebracht. Andererseits wurde auch vorgeschlagen, daß circadiane Rhythmen mit unterschiedlicher Phasenbeziehung zueinander ultradiane Rhythmen ergeben können. Werden die SCNs zerstört, verschwinden bei Hamstern sowohl ultradiane als auch circadiane Rhythmen (Wollnik and Turek (1989)). Die Eigenschaften ultradianer Rhythmen können sich während der Ontogenie ändern. Zum Beispiel kann die Periode sich verlängern. Ultradiane Rhythmen sind gut ausgeprägt, wenn auch der circadiane Rythmus klar ist. Bei Vögeln scheinen ultradiane Rhythmen die soziale Synchronisation der Nestlinge zu verstärken und die Tiere wachsen schneller.

## Kapitel 2

# Rhythmen des Menschen

Hier sollen von den zahlreichen circadianen Rhythmen des Menschen der Schlaf-Wach-, Aktivitäts- und Körpertemperatur-Rhythmus näher besprochen werden. Dann soll kurz auf Rhythmen im endokrinen System eingegangen werden. Welche Modelle eignen sich, diese Rhythmen zu beschreiben? Wie ist das circadiane System des Menschen organisiert und wo sind die kontrollierenden Zentren im Gehirn lokalisiert? Welche Rolle spielen circadiane Rhythmen bei Schichtarbeit und Jetlag? Schließlich werden einige medizinische Aspekte beleuchtet.

## 2.1 Einführung

In unserem Körper kommen viele Rhythmen vor, von hochfrequenten im Stoffwechsel, im Nervensystem, in hormonellen und exkretorischen Vorgängen bis zu sehr langsamen. Von diesen sind circadiane Rhythmen am besten untersucht (Rapp (1979)). Welche Eigenschaften haben sie? Wie interagieren sie mit anderen circadianen, ultradianen und infradianen Rhythmen? Wo sind die steuernden Zentren lokalisiert? Wie werden sie auf den 24 Stunden Tag synchronisiert? Welche Bedeutung haben sie für den gesunden und kranken Menschen? Damit beschäftigen wir uns in weiteren Abschnitten.

Ultradiane Rhythmen hatten wir im vorausgegangenen Abschnitt kennengelernt. Als Beispiel eines ultradianen Rhythmus beim Menschen wurde der REM-Schlaf vorgestellt. Infradiane Rhythmen haben Perioden, die länger als Tagesrhythmen sind. Hierzu gehören Monatsund Vierzehntagesrhythmen, Jahresrhythmen<sup>1</sup> und Rhythmen mit noch längeren Perioden. In den nächsten Abschnitten werden einige circadiane Rhythmen des Menschen vorgestellt.

## 2.2 Circadiane Rhythmen des Menschen

Erwachsene sind etwa zwei Drittel eines Tages wach. Den Rest verbringen sie im Schlaf. Auch wenn wir keine Uhren haben, ist das so. Denn unsere Umwelt enthält viele Informationen über die Tageszeit: Licht und Dunkelheit, Sonnenstand, Verkehrsgeräusche, das Verhalten der Mitmenschen und Tiere. Aber auch ohne diese 'Zeitgeber' bleibt dieser Rhythmus erhalten. In Räumen, die von der Umwelt und

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Jahresrhythmen gibt es für die Konzeption, Mortalität, Selbstmordrate, die Zunahme an Länge und Gewicht bei Kindern, OHCorticodteroide, Cortisol und Testosteron (Aschoff (1981a), Roenneberg and Aschoff (1990a), Roenneberg and Aschoff (1990b)).

ihren Einflüssen völlig isoliert sind, in Höhlen, in der Arktis oder Antarktis im Sommer (Dauerlicht) oder im Winter (Dauerdunkel) behält man den üblichen Schlaf-Wach-Rhythmus bei. Allerdings verschiebt sich der 'subjektive' Tag gegen den objektiven 24-Stunden Tag, weil er länger ist. Eine bestimmte Person, die in einem Isolierraum ohne Zeitgeber lebt, könnte beispielsweise einen Eigentag von 25.3 Stunden haben: Jeden Tag geht sie (im Durchschnitt) 1.3 Stunden später schlafen und steht entsprechend später auf. Nach zehn Tagen ist ihr Rhythmus um 13 Stunden gegen die Außenwelt verschoben (Abbildung 2.1). Der Schlaf-Wach-Rhythmus des Menschen wird demnach von einer inneren Uhr gesteuert. Sie ist circadian (etwa 24-stündige Periodenlänge) und wird normalerweise von den Zeitgebern der Umwelt auf den 24-Stunden-Tag synchronisiert. Ohne diese Zeitgeber läuft die innere Uhr frei.

Selbst unter normalen Umweltbedingungen kann man gelegentlich bei einigen Menschen Freilauf des Tagesrhythmus beobachten (siehe Abbildung 2.2).<sup>2</sup>

Eionige Säuglinge zeigen ihn, bevor sie auf den 24-Stunden-Tag synchronisiert sind (linker Teil der Abbildung 2.3). Zwar ist bei ihnen das Schlaf-Wach-Muster nicht so klar wie bei Erwachsenen, weil ein etwa vierstündiger ultradianer Rhythmus den Tagesrhythmus überlagert. Er läßt sich aber am Beispiel im linken Teil der Abbildung bis zur 16ten Woche mit 25 stündiger Periodenlänge erkennen. Erst danach synchronisiert der Rhythmus auf den 24-Stunden-Tag. Das Beispiel auf der rechten Seite der Abbildung zeigt an einem Indischen Kleinkind, dass der Tagesrhythmus auch von der Ge-



Abbildung 2.1: Schlaf-Wach-Rhythmus einer Versuchsperson in einem unterirdischen Appartment ohne Zeitgeber. Die täglichen Wachzeiten (rote Balken) und Schlafenszeiten (schwarze Balken) sind für 32 Tage untereinander aufgezeichnet, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit drei aufeinander folgende Tage auf der x-Achse abgetragen sind. Es wurde aber jeweils nur eine Wach- und Schlafenszeit eingetragen. Nach Wever (1979). D028/crbunker

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>So berichtet Kokkoris et al. (1978) von einem 34 Jährigen, der 8 Jahre lang einen 24,8h Rhythmus seines Schlaf-Wachens hatte. Er vermutet einen physiologischen Defekt in der Regulation des circadianen Systems oder im Synchronisations-Mechanismus. Wir (Giedke et al. (1983)) untersuchten einen Studenten, der ebenfalls trotz normaler Umwelt einen Freilauf zeigte.



Abbildung 2.3: Links: Trink- (Punkte), Schlaf- (horizontale Striche) und Wachzeiten (helle Stellen) eines amerikanischen Kleinkindes in den ersten 26 Wochen nach der Geburt. Zwischen der achten und siebzehnten Woche ist ein Freilauf mit einer Periodenlänge von etwa 25 Stunden zu erkennen (schräge Linien). Von der neunzehnten bis einundzwanzigsten Woche ab ist das Schlaf-Wach-Verhalten des Kindes auf den 24-Stunden-Tag synchronisiert (senkrechte Linien im unteren Teil der Abbildung). Nach Kleitman and Engelmann (1953). Rechts: Schlaf- (horizontale Striche) und Wachzeiten (helle Stellen) eines Süd-Indischen Kleinkindes in den ersten 184 Tagen nach der Geburt. Das Schlaf-Wach-Muster ist von Anfang an auf den 24-Stunden-Tag synchronisiert. Daten von Marimuthu, Madurai, Tamil-Nadu, Indien. E030 und D030Da/baby-r



Schlaf-Abbildung 2.2:Freilauf des Wachrhythmus einer Person trotz normaler Umweltbedingungen. Aufeinander folgende Tage untereinander angeordnet, Tageszeit auf der oberen x-Achse. Während der nicht markierten Zeiten war die Versuchsperson wach, während der mit Balken angegebenen Zeiten schlief sie. Man beachte die teilweise Synchronisation zwischen dem 14. und 23. September. Nach Giedke et al. (1983). E029/fr-normaltag

burt an synchronisiert sein kann. Siehe auch die Spezialstudie 'Ontogenie des circadianen Systems beim Menschen' (20.3).

Auch bei Blinden kann man gelegentlich Freilauf unter Normaltag-Bedingungen beobachten (siehe Abschnitt 20.5).<sup>3</sup>

Neben dem Wechsel zwischen Schlaf und Wachen wird auch die lokomotorische Aktivität, die Körpertemperatur des Menschen, die Nahrungsaufnahme und viele andere Vorgänge im Körper tagesrhythmisch gesteuert. Circadian schwanken ausserdem cardiovaskuläre, respiratorische, metabolische und gastrointestinale Vorgänge. Niere und die sie beeinflussenden Hormone, geistige Leistungen (Colquhoun (1981)), das endokrine System und viele andere Prozesse im Körper des Menschen werden circadian kontrolliert (Minors and Waterhouse (1981)). Bevor wir etwas über einige dieser Rhythmen hören, sollten jedoch erst die charakteristischen Eigenschaften circadianer Rhythmen erwähnt werden. Siehe dazu auch Aschoff and Wever (1981), Minors and Waterhouse (1981), Moore-Ede et al. (1982).

## 2.2.1 Eigenschaften circadianer Rhythmen

Circadiane Rhythmen haben eine Reihe charakteristischer Eigenschaften:

- Es sind selbsterregte Schwinger. Sie zeigen deshalb auch unter Zeitgeber-freien Bedingungen circadiane Rhythmen ('Freilauf'): Ihre Periodenlänge ist in aller Regel etwas kürzer oder länger als genau 24 Stunden (siehe dazu 406).
- 2. Circadiane Rhythmen lassen sich synchronisieren. Zeitgeber dafür sind vor allem

 $<sup>^{3}</sup>$ Miles et al. (1977) untersuchte 50 Blinde. 20 von ihnen zeigten Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus, einer einen Freilauf von 24.9h.

der Licht-Dunkel-Wechsel des Tages, aber auch tagesperiodische Temperaturunterschiede, elektromagnetische Felder. Beim Menschen wirken auch soziale Zeitgeber und Uhren synchronisierend.

- Die Periodenlänge der circadianen Rhythmen wird kaum von der mittleren Umgebungstemperatur beeinflußt. Sie ist 'temperaturkompensiert' (Bruce and Pittendrigh (1956), siehe auch Abschnitt 18.5).<sup>4</sup>
- Die Periodenlänge circadianer Rhythmen kann von verschiedenen Faktoren und Bedingungen beeinflußt werden. Beispiele beim Menschen: Lichtintensität, Lichtmodalität, elektromagnetische Felder, Arbeit, psychische Faktoren, sozialer Kontakt (Wever (1979), Moore-Ede et al. (1982)).
- 5. Circadiane Rhythmen gibt es bereits bei Einzellern, in Einzelzellen und bei Prokaryonten (siehe die Kapitel 4,5,6).
- Circadiane Rhythmen sind genetisch programmiert. Das wurde schon von Darwin and Darwin (1880) gefordert und von Bünning (1932) experimentell nachgewiesen. Heute wird diese Eigenschaft intensiv

benutzt, um den zugrundeliegenden Mechanismus mit genetischen Methoden und Mutanten aufzuklären

## 2.2.2 Warum sind circadiane Rhythmen für den Menschen wichtig?

Circadiane Rhythmen helfen dem Menschen, sich an die zeitliche Ordnung der Umwelt anzupassen.

Zum einen kann ein bestimmter Zeitpunkt wichtig sein und durch das circadiane System aufgerufen oder erinnert werden. Möglicherweise gehört die Alarmuhr des Menschen (Kopfuhr) hierher: Manche Menschen können sich vornehmen, zu bestimmten Zeiten in der Nacht, zum Beispiel um 3 Uhr, aufzuwachen. Das gelingt ihnen auch mit einer überraschend hohen Präzision (Abbildung 2.4). Es ist bisher nicht bekannt, ob die Kopfuhr die circadiane Uhr benutzt. Der 'Zeitsinn´ der Insekten ist ein Beispiel aus dem Tierreich (siehe Seite 170).



Abbildung 2.4: Manche Menschen besitzen eine Kopfuhr. Durch sie können sie zu Nachtzeiten ohne Wecker wach werden. Hier sind vier Beispiele von Personen, die ihre Kopfuhr sehr wirksam benutzen können. Nach Clauser (1954). D010A1/kopfuhr

 $<sup>{}^{4}\</sup>mathrm{Es}$  gibt aber auch Gebiete ohne Temperaturschwankungen wie manche tropische Regionen oder tropische Meere. Tatsächlich ist die Periodenlänge tropischer Pflanzen stärker von der Umgebungstemperatur abhängig als die anderer Pflanzen. Phaseolus mungo zum Beispiel hat bei 17<sup>0</sup>C eine Periodenlänge von 32 Stunden (Mayer (1966)). Bei Neurospora gibt es Mutanten, bei denen die Temperaturkompensation des Konidienrhythmus verloren gegangen ist ( Loros and Feldman (1986)). Die Temperaturkompensation ist demnach nicht unbedingt eine essentielle Eigenschaft circadianer Mechanismen. Andererseits gibt es auch ultradiane Rhythmen mit Temperaturkompensation (siehe Seite 17 und Lloyd and Rossi (1992)). Ferner kann die Art der Temperaturkompensation auch von der Stoffwechselsituation abhängen, wie bei Euglena gezeigt wurde (Brinkmann (1973)).

Zum anderen werden metabolische und physiologische Vorgänge, geistige Leistungen oder Verhaltensweisen an die tagesperiodische (oder auch an die monatliche oder jahresperiodische) Umwelt angepaßt. Es entstehen Muster zeitlicher Ordnung, die den Stoffwechsel, physiologische Vorgänge, Entwicklung und Fortpflanzung an die Umwelt anpassen. Bei photoperiodischen Vorgängen (Thomas (1998)) wird ein circadianer Rhythmus benutzt, um die Tageslänge zu messen und damit die Jahreszeit zu bestimmen. Photoperiodische Zeitmessung ist wiederum der wichtigste Zeitgeber für Jahresrhythmen. Ob beim Menschen auch photoperiodische Reaktionen ablaufen, ist unbekannt. Aber es gibt Hinweise, daß beim Menschen Jahresrhythmen existieren (Aschoff (1981a), Roenneberg and Aschoff (1990a,b)). Auch für die Orientierung von Tieren werden circadiane Rhythmen benutzt, wie bei der Sonnenkompaß-Orientierung (siehe Kapitel 10).

# 2.3 Schlaf-Wach Rhythmus des Menschen.

Wir verbringen etwa ein Drittel des Tages mit schlafen. Bei einem 60-Jährigen sind das 20 Jahre. Trotz seiner Bedeutung und trotz zahlreicher Untersuchungen sind die physiologischen Grundlagen des Schlafes nur unzureichend bekannt. Fragen wie 'warum schlafen wir?' oder 'was ist Schlaf?' (siehe Spezialthema 20.7) sind deshalb schwer zu beantworten, weil wir noch nicht genug über diese Grundlagen wissen. Es wird aber intensiv an diesen Fragen gearbeitet (Nicolau et al. (2000)).

#### 2.3.1 Warum schlafen wir?

Warum-Fragen sind in der Biologie als einem naturwissenschaftlichen Arbeitsgebiet etwas verpönt: Sie implizieren eine Zweck (Teleonomie), den es in der Realität nicht gibt. Jemand hat einmal gesagt

'Mit der Teleonomie ist es wie mit einer Frau, die man sehr liebt, mit der man sich aber in der Öffentlichkeit nicht sehen lassen kann '.

Schlaf ist aber essentiell. Sonst wäre er durch Selektion eliminiert. Die meisten Säuger verbringen einen grossen Teil ihres Lebens mit Schlafen (Campbell and Tobler (1984)). Schlafentzug über längere Zeit ist schädlich oder gar fatal (Everson et al. (1989)).

Warum wir schlafen ist eine sehr komplexe Frage (Nicolau et al. (2000)). Wahrscheinlich entstand er im Laufe der Phyllogenie bei Säugern und Vögeln im Zusammenhang mit der Evolution der Gehirne aus einem Vorderhirn zu einem mehrschichtigen Neocortex (Säuger) oder neostriaten Hirn (Vögel). Es mußte mit zwei verschiedenen Arten des Wachzustandes klar kommen. Die ältere war für die diurnale Aktivität während der Lichtperiode verantwortlich. Bei den Säugern wurde dieser ursprünglichere Typ des Wachseins, der durch den Hirnstamm kontrolliert wurde, unterdrückt (und blieb als ein nichtaktiver Zustand im 'slow wave sleep' erhalten). Ein neuer Typ des Wachseins wurde auf den Cortex übertragen, nachdem die Homeothermie erfunden war und eine nächtliche Lebensweise sich durchsetzte. Die nächtliche Ruhe der Poikilothermen ist möglicherweise noch als REM (rapid eye movement) Schlaf übrig geblieben. Die komplexe Struktur der Säuger ist nach dieser Vorstellung also nur ein Überbleibsel der Evolution. Corticale Kontrolle des Wachzustandes ist die eigentliche Neuerung der Säuger.

Eine Reihe von Vorschlägen wurde gemacht, warum wir schlafen:

- Schlaf ist die Folge des Wachens. Wenn wir oder ein Tier eine gewisse Zeit des Tages aktiv waren, werden wir automatische müde und schlafen ein. Das wurde experimentell geprüft. Ratten hatten Zugang zu Laufrädern, in denen sie normalerweise bis zu sieben Kilometer pro Nacht liefen. Wurde ihnen der Zugang zu den Laufrädern verwehrt, schliefen sie trotzdem wie sonst auch. Die Aktivität während des Wachseins verursacht demnach nicht das Schlafen. Andererseits wird der Schlafbedarf erhöht, wenn die Wachzeit länger ist.
- Im Schlaf wird weniger Energie gebraucht. Schlaf könnte also nach dieser Vorstellung den Energieverbrauch drosseln und damit Erschöpfung vermeiden. Dagegen spricht aber das im vorausgegangenen Punkt gesagte.
- Schlaf dient der Erholung. Während des Schlafes könnte das Zentralnervensystem gewartet und repariert werden.
- Es wurde auch vorgeschlagen, dass wir schlafen, um gefährlichen Situationen während der Nacht zu entgehen, die durch Dunkelheit, Kälte und Räuber entstehen können.
- Schlafen wir, weil es Zeit dazu ist? Für diesen Vorschlag spricht die Beobachtung, daß am Morgen von einem kritischen Zeitpunkt an die Müdigkeit wieder verschwindet, wenn wir in der Nacht nicht geschlafen haben (Abbildung 2.5).

Müdigkeit schwankt tagesperiodisch. Das spricht dafür, daß eine innere Uhr den Schlaf kontrolliert. Wir werden darauf zurückkommen (siehe Unterabschnitt 2.3.3).



Abbildung 2.5: Circadianer Rythmus der Müdigkeit während eines Schlafentzuges. Fünfzehn Frauen wurden für 72 Stunden wach gehalten. Sie gaben alle drei Stunden an, wie müde sie sich fühlten mit 100% als normaler Müdigkeit. Durchschnittswerte. Nach Akerstedt and Fröberg (1977). D030B/ rhy-tiredness

#### 2.3.2 Physiologie des Schlafes

Beschwerde-Kasten: Dieser Unterabschnitt muss überarbeitet werden. Neuere Übersichtsartikel berücksichtigen

Schlaf wird untersucht, indem man elektrische Potentiale vom Schädel (EEG) oder der Oberfläche des Cortex ableitet (ECoG). Die Signale werden ausgewertet und zeigen die verschiedenen Frequenz-Komponenten (Hoofdakker (1966)).

Die neurophysiologischen Grundlagen der EEG Signale sind eingehend untersucht worden und grosse Fortschritte wurden gemacht (Lopes da Silva (1990), Steriade et al. (1991), Steriade et al. (1993)). Die dominanten Frequenzen des 'slow-wave sleep'- EEG (langsame Wellen und Spindel-Oszillationen) korrelieren gut mit Schwingungen thalamocorticaler Neuronen. Wenn das Hirn vom Wach- oder REM-Zustand (desynchronisiert!) zum slowwave Schlaf übergeht (synchronisiert!), hyperpolarisieren die Membranpotentiale der thalamocorticalen Neuronen. Ausserdem beginnen diese Neuronen in rhythischen Schüben zu feuern. Calcium-Einströme und Kaliumvermittelte Aktionspotentiale sind beteiligt. Diese Vorgänge entsprechen den Beobachtungen am EEG (Aeschbach and Borbely (1992)).

Neuere Experimente zeigten (Gallopin et al. (2000)), daß eine bestimmte Gruppe von Zellen im ventrolateralen präoptischen Kern (VLPO) des präoptischen Gebiets eine Schlaf-fördernde Funktion haben. Es ist eine homogene Gruppe von Zellen, die durch monoaminerge und cholinerge Neuronen des Wachystems während der Wachphase gehemmt werden. Sie sind also im Wachzustand inaktiv. Zu Beginn des Schlafes beginnen diese Neuronen ihre Feuer-Frequenz unter dem Einfluss circadianer Eingänge von der Retina und dem SCN und unter dem Einfluss homöostatischer Faktoren (Körpertemperatur) und Schlaf-fördernder Faktoren zu erhöhen. Die zunehmende Aktivität ihrer GABAergen Neuronen hemmt die Wach-Zentren, auf die sie projizieren. Dadurch werden sie von den Wach-Zentren weniger gehemmt, sodass ihre Aktivität weiter zunimmet. All das erleichtert diesen Neuronen, den Schlaf zu fördern (siehe Abbildung 2.6 und Gallopin et al. (2000)).

Weitere Zellgruppen mit ähnlichen Eigenschaften könnten in anderen Gebieten des basalen Vorderhirns und der präoptischen Region vorhanden sein. Aber retinale und SCN-Eingänge finden sich nur im ventrolateralen präoptischen Kern.

Die genetische und molekulare Kontrolle des Schlafs der Säuger wird ebenfalls untersucht. Man sucht dabei nach 'Schlaf-Genen' (Kolker and Turek (1999)).



Abbildung 2.6: In einer bisher nicht bekannten Weise stimuliert das circadiane System (cR) und Schlaf-Substanzen (slS) des Körpers das VLPO Gebiet. Dadurch werden Wachzentren (WC) über GABAerg Neuronen (roter Pfeil nach oben) gehemmt (-). Wachzentren induzieren Wachheit über serotonerge (5HT), noradrenerge (NA) und cholinerge (ACh) Neuronen (grüne Pfeile, +). Die Wachzentren hemmen das VLPO Gebiet (rote Pfeile, -), wodurch die GABAergen Neuronen weiter gehemmt werden. Nach Gallopin et al. (2000). E030Cv/sleepmodel

#### 2.3.3 Circadiane Kontrolle des Schlafs

Dass der Schlaf-Wach-Rhythmus des Menschen und anderer Säuger von der circadianen Uhr kontrolliert wird, zeigt sich unter Konstant-Bedingungen ohne Zeitgeber. Der Schlaf-Wach-Zyklus läuft dann weiter, aber die Periode ist bei den meisten Menschen länger als 24 Stunden. Im Schnitt beträgt sie 25 Stunden (Bereich von 23 bis 28 Stunden). Daß ein circadianer Oszillator den Schlaf kontrolliert, wird auch durch den bergenzten Mitnahmebereich dokumentiert: Wenn wir versuchen, in einem nicht-24-Stunden-Tag zu leben, schaffen wir das nur innerhalb bestimmter Grenzen (Mitnahmebereich ist 18.5-33.5 Stunden, siehe Seite 57). SCN Läsionen beim Pinseläffchen zeigten, daß Schlaf aktiv durch den SCN gefördert oder erleichtert wird. Zur circadianen Kontrolle des Schlafes durch den SCN kommen noch homöostatische Prozesse (Edgar et al. (1993a)).

Der circadiane Oszillator kontrolliert auch die lokomotorische Aktivität (Abbildung 2.1) und andere Ereignisse. Es gibt aber eine Reihe von Befunden, die dafür sprechen, daß das gesamte circadiane System nicht nur durch *eine* circadiane Uhr beeinflusst wird. Offenbar ist ein Multioszillatorsystem am Werk, wie später diskutiert wird (Unterabschnitt 3.4).

Für Literatur zur circadianen Kontrolle des Schlafes und der zeitlichen Charakteristik siehe Webb and Dube (1981).

## 2.3.4 Schlafstörungen and circadianer Rhythmus

Schlafstörungen kommen häufig vor.<sup>5</sup>Sie sind nicht nur störend, sondern auch gefährlich.

Narkolepsie ist ein Beispiel,<sup>6</sup> Schlafwandeln ein anderes. Krippentod (sudden infant death syndrome, SIDS) tritt ebenfalls im Schlaf auf. Mehr Details über Schlafstörungen und ihre Therapie in Eastman et al. (1995), Richardson and Malin (1996), Czeisler and Dijk (1995) und Kelly (1991a).

Schlafstörungen werden eingeteilt in

- 1. Einschlafen und Durchschlafen,
- 2. Schlaflosigkeit,
- 3. Hypersomnie (beispielsweise Narkolepsie, Schlaf-Apnoe, idiopathische Hypersomnie),
- Störungen des Schlaf-Wach-Musters und Dysfunctionen des mit Schlaf verbundenen Verhaltens (zum Beispiel, vor allem bei Kindern, Albträume, Schlafwandeln, Bettnässen).

Wir werden uns auf Schlafstörungen beschränken, die mit dem circadianen System zu tun haben.

Temporäre Schlaflosigkeit kommt oft vor, wenn sich die Phasenbeziehung des Schlafes in Bezug auf den Tag-Nacht-Rhythmus geändert hat.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Etwa 15% der Bevölkerung industrialisierter Länder klagen über chronische, 20% über gelegentliche Schlafstörungen. In den Vereinigten Staten leiden etwa 29 bis 39% der über 18 Jahre alten Bewohner darunter

<sup>(</sup>das entspricht 45 bis 60 Millionen Menschen). Davon werden 8 bis 12 Millionen medizinisch behandelt. 4 bis 6 Millionen benutzen Schlafpillen. 1977 wurden etwa 25.6 Millionen Schlafpillen verschrieben. Weitere 30 Millionen Pillen wurden ohne Verschreibung gekauft.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>plötzliche kurze Schlafattacken während des Wachseins. Sie sind mit einem niedrigen Muskeltonus ('Kataplexie') verbunden und dauern gewöhnlich 10-20 Minuten. Typisch ist ein leerer Blick. Es handelt sich um einen fragmentierten REM-Schlaf; Das EEG ist wie im REM-Schlaf. Nach der Attacke fühlt sich die betroffene Person erfrischt. Routinearbeit wird fortgesetzt, ist aber mit vielen Fehlern behaftet. Wegen der Atonie in diesem Zustand kann es leicht zu Autounfällen kommen. In etwa 0.04 bis 0.09 % der Fälle vonNarkolepsie fallen die betroffenen Personen in Koma.

Diese Beziehung kann bei Schichtarbeitern (siehe Abschnitt 2.10) und bei Jet lag gestört sein (siehe Abschnitt 2.11). Im Fall eines verzögerten Schlafphasen-Syndroms ist das Einschlafen gestört. Es kommt häufig bei Menschen vor, die zum Abendtyp gehören. Sie haben keine Probleme, wenn sie zum Beispiel zwischen 4 Uhr und 12 Uhr Uhr einschlafen. Ihr Schlaf ist also nicht per se gestört. Er ist nur schlecht an den Tag-Nacht-Rhythmus angepasst. In solchen Fällen ist eine Therapie angebracht, bei der der Rhythmus durch 'reset' wieder normalisiert wird. Schlafstörungen vieler Schichtarbeiter könnten vermieden werden, wenn bessere Schicht-Pläne verwendet würden, wie in Abschnitt 2.10 gezeigt. Selbst das 'normale' Schlafmuster ist vielleicht nicht optimal.

Es gibt Hinweise, daß ein bimodaler Schlaf (Siesta zusätzlich zum Nachtschlaf) natürlicher ist (Abbildung 2.7, Wehr et al. (1993)) und erholsamer (Strogatz et al. (1987)). Er kommt bei älteren Menschen häufiger vor (Carskadon and Dement (1987)).

In einigen Fällen ist die Schlafenszeit einer Person nicht mit dem 24 StundenTag synchronisiert. Stattdessen zeigen diese Menschen Freilauf mit einer Periodenlänge, die der Geschwindigkeit ihrer circadianen Uhr entspricht. Solche Personen haben Schlafschwierigkeiten während der Zeit, zu denen ihre aktive Phase mit der Nachtzeit zusammenfällt (Kokkoris et al. (1978)). Der Schlaf von Blinden ist aus dem gleichen Grund oft gestört (siehe Abschnitt 20.5).

Schlafstörungen wurden in einer Reihe von Geisteskrankheiten (Roth and Roehrs (2000)) wie Schizophrenie (Roschke and Aldenhoff (1993), Dealberto (1992), Keshavan et al. (1990)), Epilepsie (Shome (1996)) und endogene Depressionen (Southmaid et al. (1991), Roschke et al. (1994), Goldenberg (1993); siehe auch Abschnitt 20.11) gefunden. Bei Narkoleptikern (Kahn et al. (2001)) ist das circadiane



Abbildung 2.7: Schlaf einer jungen Frau unter langen künstlichen Nächten mit 14 Stunden Dauer, oberer Teil, und unter 8 Stunden (unten). Die schwarzen Balken zeigen den elektrophysiologisch erfassten Schlaf. Beachte das bimodale Schlafmuster in der Zeit mit langen Nächten mit 3-5 Stunden Schlafschüben, die durch 1-2 Stunden Wachsein unterbrochen sind. Das war vielleicht einmal das normale Schlafmuster vor der industriellen Revolution, als die meisten Menschen von Sonnenuntergang bis Sonnenaufgang schliefen. Nach Wehr et al. (1993). D030D/ bimodal sleep

System geändert, aber prinzipiell intakt. Unter Schizophrenie leidende gehen früh zu Bett und stehen früh auf. Manisch-Depressive gehen spät zu Bett und stehen spät auf. Offenbar ist bei Narkoleptikern der ultradiane Rhythmus nicht normal (fragmentiert) und dehnt sich in die Wachperiode aus (Reid et al. (1998)). Mit einem kurzen Schlaf während des Tages (Nickerchen) können narkoleptische Attacken normalerweise vermieden werden (Naitoh (n.d.)).

#### 2.3.5 Modelle des Schlaf-Wach Zyklus

Modelle werden benutzt, um komplizierte Systeme vereinfacht darzustellen. Man kann sie testen, indem man mit den Modellen Voraussagen macht und diese dann experimentell testet. Wenn die Voraussagen nicht gefunden werden, muss das Modell geändert und erneut getestet werden.

Das soll an Modellen des Schlaf-Wach-Zyklus demonstriert werden: Um zu prüfen, ob ein Modell korrekt ist, werden experimentelle Ergebnisse gesammelt und mit den Voraussagen verglichen. So werden zum Beispiel die Schlafdauer als Funktion des Schlafbeginns, bimodaler Schlafbeginn, eine 6-stündige verbotene Zone des Aufwachens vor dem Körpertemperatur-Minimum, das Auftreten eines singulären Punktes als Tests benutzt (Jewett and Kronauer (1998)).

Die folgenden Modelle wurden speziell aufgestellt, um den Schlaf-Wach-Zyklus zu erklären:

• Das Zwei-Prozess-Modell der Schlafregulation von Daan et al. (1984) (siehe auch Daan and Beersma (1984)). Ein circadianer Rhythmus C (Schlaf-unabhängig) und ein homöostatischer Prozess S (Schlafabhängig) interagiern miteinander. Eine Schwelle H bestimmt dabei das Einschlafen und eine Schwelle L das Aufwachen (siehe Abbildung 2.8). Das Modell wurde an Ratten und Menschen getestet.

- Winfree (1983) erklärt die Abhängigkeit der Schlafdauer vom Einschlafzeitpunkt durch ein topologische Modell.
- Ein thermoregulatorisches Modell der Schlafkontrolle beim Menschen wurde von Nakao et al. (1999) beschrieben.

Andere Modelle werden später beschrieben (siehe Seite 54).

## 2.4 Circadiane Kontrolle der Körpertemperatur

Zur Kontrolle der Temperatur bei homöothermen Tieren siehe Seite 428. Der Temperaturverlauf ist nicht konstant, sondern schwankt tagesperiodisch. Dieser Rhythmus ist endogen, also auch unter konstanten Bedingungen vorhanden und unabhängig von den Aktivitäten des Tieres (Abbildung 3.10). Er wird von einem Oszillator bestimmt, der auch die Zusammensetzung des Urins, die Cortisonsekretion und andere Vorgänge kontrolliert.

Die tagesperiodische Schwankung der Körpertemperatur wurde bereits von De Gorter (1736) beobachtet. Simpson and Galbraith (1906) beschrieben Temperatur-Zyklen eines Rhesusaffen nicht nur im Licht-Dunkel-Wechsel, sondern auch im Dauerlicht. Damit war die endogene Natur der Körpertemperaturschwankung nachgewiesen (was bei anderen Körperfunktionen schon viel früher bekannt war). Menaker (1959) wies circadiane Schwankungen der Körpertemperatur bei der Fledermaus nach. Ralph and Menaker (1988) fanden eine Hamstermutante, deren Körpertemperatur mit 20 statt 24 Stunden rhythmisch schwankte; in 5 Tagen



Abbildung 2.8: Ein Zwei-Prozess-Modell der Schlafregulation: Ein circadianer Rhythmus (Prozess c, Schlaf-unabhängig, blaue Kurve) und ein homöostatischer Prozess s (Schlaf-abhängig, rote Kurve) interagieren miteinander. Eine Einschlaf-Schwelle (wenn die rote Kurve die blaue berührt) und eine Schwelle fürs Aufwachen (die rote Kurve berührt eine Schwelle in ihrem untersten Punkt) sind dabei wichtig. Das Modell wurde an Ratten und am Menschen gestestet. Nach Daan et al. (1984), siehe auch Daan and Beersma (1984). D030En/twoprocess-modell-sleep



Abbildung 2.9: Verlauf der Körpertemperatur des Menschen bei Synchronisation mit dem 24-Stunden-Tag (erster Teil, 'synchronisiert') und im Freilauf (zweiter Teil, 'freilaufend'). Obere Leiste zeigt Wach- (hell) und Schlafzeiten (dunkel). Nach Aschoff (1981b). D031/ktr-mensch

durchliefen sie also 6 circadiane Zyklen. Zwischen 1967 und 1990 sind etwa 2700 Publikationen über circadiane Rhythmen der Körpertemperatur erschienen, also über 100 pro Jahr. Ein Artikel von Refinetti and Menaker (1991) gibt eine Übersicht.

Die Wärmeproduktion trägt mit 25% zum rhythmischen Schwanken der Körpertemperatur bei, die Wärmeabgabe (Haut, Blutzirkulation, schlecht isolierte Körperteile wie Extremitäten) mit 75% (die Werte sind von der Außentemperatur abhängig). Die Wärmeabgabe unterliegt besonders stark der circadianen Regelung. Die Körpertemperatur- und Hauttemperatur-Rhythmen unterscheiden sich in ihrer zeitlichen Lage voneinander (siehe Abbildung 2.10). Änderungen der Blutzirkulation zur und von der Haut der Extremitäten, Unterschiede in den zentralen Sollwerteinstellungen und wie empfindlich oder wirksam thermoregulatorische Effektormechanismen sind, spielen dabei eine Rolle. Dazu kommen rückkoppelnde Wirkungen des Verhaltens.

Die Körpertemperatur eines Menschen, der von 23 Uhr bis 7 Uhr schläft, sieht typischerweise (Bewohner von Paris und Sydney) folgen-



Abbildung 2.10: Die Kerntemperatur- und Fußtemperatur-Rhythmen haben eine gegensinnige Lage zueinander: Während die Kerntemperatur (rektal gemessen, in Grad Celsius) am Tage höher als in der Nacht ist, ist die Fußtemperatur in der Nacht höher als am Tage (Abweichungen vom Tagesmittel, in Prozent). Nach Hildebrandt et al. (1998). D032/psi-ktrhtr

dermaßen aus: 3 Stunden vor dem Aufwachen  $36.5^{0}$ , um 9 Uhr  $37.2^{0}$ , um 20 Uhr  $37.4^{0}$ , und um 4 Uhr  $36.5^{0}$ . Das Maximum wird um 17 Uhr erreicht. Bei Bewohnern von Colombo (Sri Lanka) liegt das Maximum bereits um 12 Uhr, obwohl sie nur 1 Stunden früher aufstehen und schlafen gehen. Die Ursache dieses Unterschieds ist unbekannt.

Unter konstanten Bedingungen und ohne Zeitgeber beträgt die Periodenlänge der Körpertemperatur im Mittel 25 h. Im Gegensatz zu synchronisierten Bedingungen ist dann der Körpertemperatur-Rhythmus um 4 Stunden gegenüber dem Aktivitätsrhythmus verfrüht<sup>7</sup>.

Schlaf erfolgt unter konstanten Bedingungen zu Zeiten niedriger Körpertemperatur. Nickerchen dagegen nimmt man zu Zeiten hoher Körpertemperatur.

Untersuchungen Die meisten zum Körpertemperatur-Rhythmus wurden bei durchgeführt neutraler Außentemperatur  $(32^{0}C)$ , bei der die thermoregulatorischen Reaktionen kaum aktiviert werden müssen. In einigen Fällen wurde aber auch die Außentemperatur variiert. Bei höherer Temperatur der Umwelt verringert sich die Amplitude des Körpertemperatur-Rhythmus, bei niedrigerer erhöht sie sich (Pinselaffe: um  $1.6^0$  bei  $32^0$ , um  $2.4^0$  bei  $20^0$  und um  $1.0^0$  bei  $36^0$ ). Das liegt daran, daß die Wärmeabgabe besonders stark der circadianen Regelung unterliegt und bei niedriger Außentemperatur die Wärmeabgabe besonders stark ist.

Die Körpertemperatur verläuft oft biphasisch, also mit einer Absenkung um die Mittagszeit (Abbildung 2.11, Aschoff (1966)). Warum gibt es überhaupt einen Rhythmus der Körpertemperatur? Die Energieersparnis ist zumindest bei größeren Säugern zu gering (nämlich 260 kJ pro Tag bei  $1^{0}C$  Amplitude). Das sind weniger als 3% der 2400 kCal pro Tag. Außerdem gibt es auch im Winterschlaf noch diesen Temperatur-Unterschied im Tagesgang (siehe Unterabschnitt 12.4.4). Die Frage ist bisher nicht zu beantworten.

Neben circadianen Schwankungen gibt es auch infradiane (weiblicher Menstrualzyklus:  $0.4^{0}$ C höher zu Beginn der Lutealphase nach der Ovulation) und ultradiane ( $0.3^{0}$ C Zyklus der Achsel-Temperatur mit einer Periode von 30 Minuten, 2-6 Stunden-Rhythmen der abdominalen Hauttemperatur bei Neugeborenen).

Schlaf-Körpertemperatur und Wach-Rhythmus: Normalerweise sind Körpertemperaturund Schlaf-Wach-Rhythmus im gleichen Takt. Auch der circadiane Rhythmus der Aktivität und der Körpertemperatur verlaufen parallel. Die Körpertemperatur und die Aktivität sind zur gleichen Zeit hoch. Unter bestimmten Bedingungen sind sie jedoch nicht mehr miteinander gekoppelt und können sich voneinander trennen. Es zeigt sich eine interne Desynchronisation (Abbildung 2.12). Daraus wurde gefolgert, daß mehrere Oszillatoren miteinander hierarchisch und nicht-hierarchisch gekoppelt sind.

Es gibt weitere Hinweise, daß der circadiane Rhythmus der Körpertemperatur nicht nur eine passive Folge der Aktivität ist:

- 1. der circadiane Rhythmus der Körpertemperatur liegt früher als der der Aktivität, die Temperatur ist also schon vor dem Aufstehen erhöht.
- 2. Zwar sinkt die Körpertemperatur beim Einschlafen, aber nur um 10% des Betra-

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup>aber nicht bei Tieren. Bei Tieren dämpft auch der circadiane Rhythmus der Körpertemperatur in Zeitgeber-freier Umgebung aus. Auch der Aktivitätsrhythmus und der Trinkrhythmus sind gedämpft. Vielleicht entsteht unter konstanten Bedingungen Desynchronie, die das Dämpfen verursacht. Der Rhythmus läßt sich wieder neu anstossen.


Abbildung 2.11: Biphasischer Verlauf der Körpertemperatur des Menschen, mit etwas geringerer Temperatur um die Mittagszeit. Zunehmendes Körpertemperaturmittel durch Östruszyklus bedingt. Nach Moore-Ede et al. (1982). D032A/ktr-biphasisch

Temperaturzyklus schwankt.

- 3. Bei Bettruhe während des gesamten Tages ist der circadiane Rhythmus der Körpertemperatur (Amplitude) nur wenig niedriger als sonst. Das gleiche gilt, wenn für 24 Stunden keine Nahrung aufgenommen wird. Das gleiche gilt,
- 4. Bei Schlafentzug über einige Tage bleibt der circadiane Rhythmus der Körpertemperatur erhalten.
- 5. Morgentypen und Abendtypen haben einen sehr ähnlichen Körpertemperaturrhythmus, obwohl sich ihr Aktivitätsrhythmus unterscheidet.
- 6. Bei Daueraktivität und gleichmäßig über den Tag eingenommener Nahrung bleibt der circadiane Rhythmus der Körpertemperatur erhalten. Nur die Amplitude ist etwas verringert.

Offenbar werden also Körpertemperatur und

ges, um den sie während des gesamten Aktivität durch eigene circadiane Oszillatoren gesteuert.

> Greift die circadiane Steuerung der Körpertemperatur am Sollwert der Temperatur ein, wird also der Sollwert tagesperiodisch verändert? Dafür sprechen eine Reihe von Befunden (Refinetti and Menaker (1991)). Zum Beispiel schwankt die Körpertemperatur auch circadian, wenn eine Person sehr lange schläft (bei Krankheiten). Bei Fieber wird der Sollwert der Temperatur erhöht, indem die Wärmeproduktion verstärkt und die Wärmeabgabe verringert wird. Aber der Körper ist sehr viel komplizierter als ein gewöhnlicher Thermostat der Ingenieure. Er besitzt keinen statischen Sollwert. Dieser wird vielmehr durch innere und äußere Faktoren beeinflußt.

> Alternativ könnte der circadiane Rhythmus der Körpertemperatur durchaus auch durch eine rhythmische Steuerung der Wärmeproduktion und Wärmeabgabe entstehen und nicht notwendigerweise durch einen circadian geänderten Sollwert (Robinson and Fuller (1999)).



Abbildung 2.12: Interne Desynchronisation beim Menschen zwischen Körpertemperatur- und Schlaf-Wach-Rhythmus unter Zeitgeber-freien Bedingungen eines unterirdischen Wohnraumes: In den ersten vierzehn Tagen verlaufen die täglichen Maxima und Minima der Körpertemperatur parallel zum Schlaf-Wach-Zyklus. Die Periodenlänge beträgt für beide Vorgänge 25.7 Stunden. Danach wird der Körpertemperatur-Rhythmus etwas kürzer (Periodenlänge 25.2 Stunden) und die Periode des Schlaf-Wach-Rhythmus verlängert sich beträchtlich auf 33.4 Stunden. Nach Wever (1979). E033/int-desyn-mensch

## 2.5 Rhythmen im endokrinen System und bei der Reproduktion

Das endokrine System des Menschen steht ebenfalls unter circadianer Kontrolle. Einige Hormone werden aber auch ultradian abgegeben, wie zum Beispiel die Sexualhormone LH und FSH.

Abbildung 2.13 zeigt das Schema der tagesrhythmischen Kontrolle von Hormonen am Beispiel des Cortisons und konjugierter Corticosteroide. Cortison und konjugierte Corticosteroide sind die wichtigsten Corticosteroide der Säuger. Corticosteroide werden aus Cholesterol in der Nebennierenrinde gebildet. Die Cortison-Konzentration ist morgens hoch und abends niedrig. Ein Minimum wird in den ersten zwei Stunden des Schlafs erreicht. Maximale Konzentrationen findet man zur Aufwachzeit. Dann nimmt sie wieder ab bis etwa 1-2 Stunden vor Beginn des Schlafes. Nimmt man mit einem Katheter alle 20 Minuten Blutproben und untersucht diese auf Corticosteroide, ergeben sich 6-9 Episoden pro Tag, also ein ultradianer Rhythmus (siehe Abbildung 2.14 und Kapitel 1), der den circadianen Rhythmus überlagert. Der Rhythmus wird weder durch das Verhalten noch durch rhythmische Umweltbedingungen beeinflußt. Er tritt nämlich auch bei konstanter Bettruhe, bei Schlafentzug und bei gleichmäßiger Nahrungszufuhr auf. Bei Neugeborenen fehlt der Rhythmus. Erst nach 2-3 Jahren ist er zu finden.

Bei fehlendem Zeitgeber hat der Cortisonrhythmus im Plasma eine Periodenlänge von 25 Stunden. Sie wird auch bei interner Desynchronisation beibehalten. Der wichtigste Zeitgeber dieses Rhythmus ist der Licht-Dunkel-Wechsel. Bei von Geburt an blinden Menschen zeigt der Cortisonrhythmus gelegentlich Freilauf. Stress erhöht die Cortisonkonzentration. Dadurch wird der Rhythmus maskiert. Bei Ratten wurde gezeigt, dass Corticosteroide auch in vitro rhythmisch sekretiert werden (Ottenweller et al. (n.d.)). Es ist nicht bekannt, wo die rhythmische Kontrolle stattfindet.



Abbildung 2.14: Tageslauf der Cortison-Konzentration im Blutplasma einer Versuchsperson. Alle 20 Minuten wurde eine Blutprobe mit einem Katheter genommen. Nach Moore-Ede et al. (1982). D035/cortisol

Auch andere Hormone wie beispielsweise Vasopressin und Oxytocin werden nur stoßweise alle 60 bis 120 Minuten sekretiert (siehe Kapitel 1). Danach werden sie abgebaut. Die Halbwertszeit beträgt nur einige Minuten bis Stunden. Dieser episodische Verlauf macht den Nachweis schwierig und stark variabel, wenn der Probenabstand zu gering ist (alle 3-4 Stunden).

Die Amplitude des Wachstumshormons GH ist hoch und schwankt um 100%. Das Maximum tritt in den ersten zwei Stunden des Schlafs auf. Der Verlauf ist unabhängig von Cortison und Insulin. Aldosteron und Prolactin schwanken um 50%, die Maxima und Minima liegen zur gleichen Zeit wie die des Cortisons. Testosteron und Tyrotropin schwanken um weniger als 20%. LH und FSH zeigen besonders starke ultradiane Schübe. LH hat bei der Frau einen menstrualen und einen circadianen Rhythmus.

Tagesrhythmen beeinflussen die Geburt. Es



Abbildung 2.13: Steuerung der tagesperiodischen Cortison-Abgabe über die Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde-Achse. Der Licht-Dunkel-Wechsel wird über die Retina der Augen wahrgenommen. Signale werden zum SCN geleitet und synchronisieren den circadianen Rhythmus dieses Schrittmachers. Von diesem wird im vorderen Hypothalamus tagesperiodisch und ultradian (und auch direkt in Stress-Situationen) der Cortison-Releasing-Faktor (CRF) abgegeben. Er verursacht im Vorderlappen der Hypophyse, daß das Adenocorticotrope Hormon ACTH ausgeschüttet wird. ACTH veranlaßt die Nebenniere, Cortison abzugeben. Es gelangt über den Blutkreislauf an verschiedene Zielorgane (Eosinophile, Plasma, Luftwege) und bewirkt in Stress-Situationen 'Kampf-oder-Flucht'-Reaktionen. Cortison wirkt hemmend auf Hypothalamus und Hypophyse zurück. Cortison und Corticosteroide werden in der Leber abgebaut und über die Niere ausgeschieden. Nach Moore-Ede et al. (1982). E034/cortisol

werden mehr Babies zwischen 3 und 4 Uhr geboren. Werden Frauen befruchtete Eier implantiert, ist das nur zwischen 22 und 24 Uhr erfolgreich (in 4 von 79 Fällen).

## 2.6 Monatsrhythmen beim Mensch

Die Reproduktion des Menschen ist wie bei allen Säugern infradian gesteuert. Östruszyklus und Menstrualzyklus sind typisch für Säuger (Abbildung 2.15).

Ferner sorgt bei Säugern oft ein circannualer Zyklus dafür, daß die Brunst zu bestimmten Jahreszeiten auftritt und damit die Geburt und Aufzucht der Jungen in günstige Zeiten gelegt wird. Beim Menschen ist der Einfluß der Jahreszeiten auf die Fortpflanzung gering, aber nachweisbar.

Die Menstruation ist eine 3-5 Tage dauernde Blutung aus der Gebärmutter. Dabei wird die Gebärmutterschleimhaut (Endometrium) abgestoßen.<sup>8</sup> Der ovarielle und uterine Zyklus beträgt im Mittel 29.5 Tage. Da der Mondumlauf siderisch 27 Tage und synodisch 29.5 Tage (da auch die Erde sich bewegt) beträgt, liegt es nahe, eine Beziehung zwischen Menstruationszyklus und Mondzyklus zu suchen. Das ist jedoch nicht der Fall. Die Menstruation der Frau ist unabhängig von der Phase des Mondes und unabhängig vom Wochentag (Pochobradsky (1974)). Bei äquatorialen Affen Südamerikas wurden tatsächlich solche Beziehungen gefunden. Die Menstruation geschieht zur Zeit des Neumondes, 14 Tage später erfolgt bei Vollmond die Ovulation und Konzeption (Erkert (1974), Erkert (1976)). Ob es sich dabei um einen Selektionsvorteil oder soziale Effekte handelt, ist unbekannt. Beim Menschen wurde

jedoch keine feste Phasenbeziehung zwischen Mondzyklus und Menstruationszyklus gefunden.

Es gibt aber einige Hinweise, daß der Menstruationszyklus zwischen Frauen synchronisiert ablaufen kann (siehe Spezialthemen 20.9). Dagegen sprechen allerdings andere Beobachtungen (Wilson (1992), Pfaff (1980), Jarett (1984), Trevathan et al. (1993)).

Gibt es auch einen Sexualrhythmus des Mannes? Parallel zum Menstruationszyklus der Frau soll die sekretive Aktivität der Anhangsdrüsen des Mannes verlaufen (Doggett and Keilers (1962)). Östrogene und 17-Kortikosteroide schwanken beim Mann im 8 bis 10 Tages-Rhythmus (Exley and Corker (1965)). Nach Maanson (1965) gibt es einen 4 Wochen-Rhythmus der Leukozyten mit Androgeninduzierten Kernanhängen in den Testikeln. Hornstein et al. (1964) finden einen 4 Wochen-Rhythmus der Urethra-Zellen des Mannes. Der Bart des Mannes wächst unterschiedlich stark mit einem 4 wöchigen Rhythmus (Kihlström (1971b), Kihlström (1971a)).

## 2.7 Organisation des circadianen Systems des Menschen

Beschwerde-Kasten: Dieser Abschnitt sollte vielleicht herausgenommen werden, da sein Inhalt im Kapitel über Rhythmen bei Mäusen enthalten ist

Das circadiane System des Menschen und allgemein der Vertebraten ist ein Multioszillatorsystem. Seine strukturellen Elemente und neuronalen Grundlagen werden zur Zeit vor allem an Hamstern und Mäusen intensiv untersucht. Dabei spielen das SCN des vorderen Hypothalamus und das Pinealorgan eine wichtige Rolle. Für Einzelheiten siehe Kapitel 3 Abschnitt 3.4 und die anschliessenden Abschnitte.

 $<sup>^{8}\</sup>mathrm{Ein}$  Modell des Menstruationszyklus der Frau wurde von Bogumil et al. (1972) aufgestellt.



Abbildung 2.15: Die Menstruation bei der Frau wird hormonell gesteuert. Vom Hypophysen-Vorderlappen (a) wird das Follikel-stimulierende Hormon abgegeben (b). Später wird vom Hypophysen-Vorderlappen das luteinisierende Hormon (c) und danach das luteotrope Hormon (d) sekretiert. Wie sie auf das Follikel einwirken, ist in (e) dargestellt. Östrogen wird vor und nach der Ovulation durch das Follikel abgegeben (f). Zusammen mit Progesteron (g) verändert es die Uterus-Schleimhaut (h). Ihre Stadien sind in der unteren Zeitskala angegeben (Mensen, Proliferation, Sekretion). Nach Sommer (1990). D036/oestrus-frau

## 2.8 Modelle circadianer Rhythmen

Beschwerde-Kasten: Dieser Abschnitt sollte kompakter werden und auf den neuesten Stand gebracht werden.

Einige Modelle wurden bereits vorgestellt, mit denen der Schlaf-Wach-Rhythmus beschrieben wurde (Unterabschnitt 2.3.5). Eine neuere Übersicht über Modelle circadianer Uhren gibt Lema et al. (2001). Als Einführung eignen sich Winfree (1987) und Friesen et al. (1993).

Modelle lassen sich einteilen in

- Mathematische Modelle, zum Beispiel Wever (1964). Sie versuchen das circadiane System allgemein zu beschreiben (zum Beispiel Jewett and Kronauer (1998), Vaz Nunes (1998), Lema et al. (2000), für ein Grenzzyklus-Modell siehe Lakin-Thomas (1995)) oder sind für bestimmte und specifische Organismen entwickelt worden (Scheper et al. (1999), Leloup and Goldbeter (1998) und Leloup and Goldbeter (2001) Modell der *per-tim* Beziehungen beim circadianen System von *Drosophila*).
- 2. Strukturelle Modelle, beispielsweise von Pittendrigh and Daan (1976): Suche nach den Strukturen, beispielsweise Morgenund Abendoszillator.
- Physiologische Modelle (Melatonin-Modell von Brown et al. (1997), thermoregulatorisches Modell der Schlafkontrolle beim Menschen von Nakao et al. (1999)).
- Neuere Modelle verwenden die Ergebnisse von Untersuchungen über den molekular Mechanismus der circadianen Uhren (Golden et al. (1998) und Ishiura et al. (1998) für *Cyanobacteria* (siehe Abbildung 6.14), Aronson et al. (1994b), Crosthwaite et al.

(1997), Merrow et al. (1997) für Neurospora (siehe Abbildung 16.15), Darlington et al. (1998), Hunter-Ensor et al. (1996), Lee et al. (1996), Shigeyoshi et al. (1997) für Drosophila (siehe Abbildung 329), Albrecht et al. (1997), Gekakis et al. (1998), Jin et al. (1999), Sangoram et al. (1998) für Säuger (siehe Abbildung 3.12)).

Der Stand der Wissenschaft liegt in der Regel zwischen (1) und (2).

Bei Oszillatormodellen wurden zunächst Einoszillatormodelle vorgeschlagen. Später zeigte sich, daß diese nicht ausreichen, um alle experimentellen Befunde zu erklären. Sie wurden deshalb durch Multioszillatormodelle ersetzt. Bei diesen spielen auch Interaktionen zwischen den Oszillatoren eine zusätzliche Rolle. Beispiele für solche Modelle sind

- Wever (1979) benutzt einen VanderPol Oszillator, um das circadiane System des Menschen zu beschreiben. Schlaf- und Wachzeiten ergeben sich aus der Lage des Gleichwertes zu einem Schwellenwert. Liegt der Schwellenwert über dem Gleichwert, ist die Wachperiode kurz und die Schlafperiode lang. Liegt er unter dem Gleichwert, ist die Schlafperiode kurz und die Wachperiode lang.
- Ein Modell von Enright (1980) macht eine genauere Uhr aus ungenauen Komponenten. Dabei spielt ein Diskriminator, eine Schwelle und Rückkopplungen eine Rolle.
- Das Kronauer-Modell (Kronauer et al. (1982)) besteht aus zwei Oszillatoren X und Y, die sich gegenseitig unterschiedlich stark beeinflussen. X steuert die Körpertemperatur, Y den Schlaf-Wach-Zyklus. Sechs Parameter beschreiben das Modell, von denen fünf bekannt sind und der sechste (Steifheit des X-Oszillators) nur geschätzt ist. Bei interner Desynchronisation

ist entweder die Kopplung zwischen den Oszillatoren gering oder die Periodenlängen der beiden Oszillatoren unterscheiden sich stark.

Gekoppelte circadiane Oszillatoren wurden auch als Modell von Gander et al. (1985) verwendet, um Phasenverschiebungen bei Jetlag zu beschreiben.

- Ein mathematisches Modell auf der Grundlage der VanderPol Gleichung mit externer Kraft wurde auf Jetlag angewendet (Gundel and Spencer (1992)).
- Ein Rückkopplungsmodell wurde von Johnsson and Karlsson (1972)) benutzt, um den Jetlag vorauszusagen und mit Beobachtungen zu vergleichen.
- Ein Modell mit einem Prozess 1 und 2 wurde von Refinetti (1993) (siehe also Refinetti (1997)) vorgeschlagen. Der Prozess 1 ist nicht Licht empfindlich. Mit dem Modell läßt sich die Phasenresponsekurve des Menschen auf Licht erklären.
- Zwei Oszillatorgruppen mit Rückkopplung und Zeitverzögerung, bei denen bis zu 30 Oszillatoren gekoppelt sind (Vaz Nunez et al. (1991)) simulieren die Variation der Periodenlänge, Splitting und Desynchronisation.
- Bei einem weiteren Modell von Carpenter und Grossberg (Carpenter and Grossberg (1983)) hemmen sich *on-* und *off-*Zellen gegenseitig, stimulieren sich aber selbst.
- Ein funktionelles Modell verschiedener Oszillatoren mit nicht zu hoher und nicht zu geringer Variabilität haben einen gemeinsamen Ausgang. Über eine Schwelle wird die Aktivität bestimmt. Es gibt eine positive Rückkopplung zum Kopplungsglied, in die auch die Zeitgeber münden (Diez-Noguera (1994)). Damit läßt sich die On-

togenie der circadianen Rhythmik bei Ratten beschreiben. Bei niedriger Kopplung ergibt sich ein ultradianes, bei hoher ein circadianes Muster. Licht senkt die Kopplung bei dunkelaktiven Tieren, verstärkt die Kopplung bei lichtaktiven Tieren.

- Strogatz (1986) schlägt ein Phasenmodell vor, in dem die Amplituden vernachlässigt werden.
- Aldridge (n.d.) benutzt ein topologisches Modell mit einem Grenzzyklus und einer Wolke von Oszillatoren.
- Ruoff und Rensing (Ruoff and Rensing (1996), Ruoff et al. (2001), Ruoff et al. (1999)) benutzen das Goodwin Modell mit drei Zustandsvariablen. Diese stehen für mRNA, das kodierte Protein, und ein Proteinprodukt, welches RNA Synthese unterdrückt. Das Modell beschreibt nicht nur allgemeine circadiane Eigenschaften, sondern auch Phänotypen von Mutanten, Wirkung von Substanzen und Temperatureeffekte.
- Scheper et al. (1999) schlagen ein Verzögerungsmodell vor. Es basiert auf molekularbiologischen Ergebnissen. Synthese und Abbau von Uhr-Proteinen und ihren mR-NA sind die Bausteine des Modells. Es wurde von Lema et al. (2000) vereinfacht.
- Lloyd and Lloyd (1993) verwenden Grenzzyklen und einen kontrollierten chaotischen Attraktor, um das circadiane System zu beschreiben. Dieses Modell erklärt auch den arrhythmischen Zustand und Abweichungen der Periodenlänge bei Mutanten.

## 2.9 Chronobiologischer Phasentyp

Sicherlich haben Sie schon von Morgen- und Abendtypen gehört und Sie können sich selbst entsprechend einordnen. Für diejenigen, die unsicher sind und nicht wissen, ob sie zum Indifferenztyp gehören (wozu die meisten Menschen gehören) oder mehr zu einem der Extremtypen neigen, steht ein Fragebogen zur Verfügung, mit dem der chronobiologische Phasentyp bestimmt werden kann (siehe Abschnitt 20.4).



Abbildung 2.16: Ergebnisse von Tests zum chronobiologischen Phasentyp des Menschen an Gruppen von Studenten aus Tübingen (Deutschland) und Madurai (Südindien). D036B/phasentyp

In Abbildung 2.16 sind die Ergebnisse dieses Tests für eine Gruppe von Studenten aus Tübingen (Deutschland) und Madurai (Indien) dargestellt. Man beobachtet in beiden Fällen eine Normalverteilung. Das ist zu erwarten, da der Test so aufgebaut ist. Der Mittelwert dieser Verteilungskurve liegt aber bei den indischen Studenten früher. Warum das so ist, ist unbekannt.

#### 2.10 Schichtarbeit

Arbeitsteilungen waren sicherlich schon beim vorgeschichtlichen Menschen verbreitet. Dabei gab es auch tageszeitliche Schwerpunkte der Tätigkeiten. Einige Mitglieder der Gruppe waren vielleicht am Abend länger als die meisten wach, andere wachten früher auf. Damit war die Gruppe vor nächtlichen Überfällen sicherer als wenn alle gleichzeitig schliefen. Es gab somit Selektionsvorteile für eine Streuung der tageszeitlichen Aktivitäten der Gruppenmitglieder. Es gab wahrscheinlich schon damals neben dem Großteil der Gruppe, der einen 'normalen' Schlaf-Wach-Rhythmus besaß, 'Lerchen' und 'Eulen', die früher oder später als die meisten Gruppenmitglieder wach waren.

Heutzutage stehen neben der Sicherheit (Polizei, Militär) soziale (Medizin, Transport, Elektrizität), technologische (chemische Industrie, Erdölindustrie, Stahlindustrie) und ökonomische Gründe (Arbeitsplatz und Energie werden besser ausgenutzt, dadurch geringere Kosten) im Vordergrund. Immerhin arbeiten in den Industrienationen etwa 20%<sup>9</sup> der Menschen in Schicht (Winget et al. (1978)), die meisten davon in der Industrie (zum Teil auch in höheren Positionen).

Es gibt verschiedene Arten von Schichtarbeit (Konjunkturarbeit, 8 oder 12h Schicht, Rotations- (Abbildung 2.17 und Knauth and Rutenfranz (1975)) oder permanente Schichtarbeit (Rutenfranz et al. (1977)). Die Nachmittagsschicht ist am beliebtesten, danach die

 $<sup>^927\%</sup>$ der Männer, 16% der Frauen (Moore-Ede and Richardson (1985))

Frühschicht, dann die Nachtschicht. Viele vermeiden Schichtarbeit und ziehen stattdessen Dauerschicht vor. Nur ein Drittel der Schichtarbeiter (und darunter mehr Frauen) machen diese freiwillig. Die meisten werden in sie hineingedrängt. Im mittleren Lebensalter ist die Bereitschaft für Schichtarbeit am höchsten. In der Jugend ist sie leichter auszuhalten. Je älter man wird, umso weniger ist man bereit, Schichtarbeit zu leisten.

Folgendes wird gegen Schichtarbeit angeführt: Gesundheitsprobleme, familiäre Bindungen, soziale Gründe, psychische Belastung.

Soziale, biologische und gesundheitliche Konsequenzen der Schichtarbeit und ihr Einfluß auf circadiane Rhythmen: Es ist schwieriger, sich an Schichtarbeit anzupassen als nach einem Flug an eine neue Zeitzone. Denn bei Schichtarbeit bleibt die soziale Zeitsituation wie zum Beispiel kulturelle Darbietungen im Fernsehen und Familienleben unverändert. Oft ist die Zeit zu kurz, sich an Schichtarbeit anzupassen oder aus den genannten Gründen unerwünscht. Besonders schwer wiegen diese Gründe bei rotierender Schichtarbeit. Allerdings hat ein Wechsel zwischen Früh-, Spät- und Nachtschicht (sogenannter 1-1-1 Schichtwechsel) kaum einen Einfluss auf das Muster des Körpertemperatur-Rhythmus. Nachteil dieser Schichtart ist, daß während der Nachtschicht die Körpertemperatur (und parallel dazu die Leistung) niedrig ist (rote Kurve in Abbildung 2.17). Andererseits dauert es lange, bis bei einer dreiwöchigen Nachtschicht der Körpertemperatur-Rhythmus sich angepaßt hat (nicht dargestellt). Rotationsschicht hat also seine Vor- und Nachteile und viel mehr Untersuchungen wären nötig, um optimale Strategien zu finden (Rutenfranz (1978), Winget et al. (1978)). Die individuelle Situation muß ebenfalls berücksichtigt werden (Fröberg (1977)).

Negative Auswirkungen der Schichtarbeit sind:

- Die Leistung flacht ab. Das wirkt sich auf die Arbeit und den Schlaf ungünstig aus. Schlafstörungen sind häufig.
- 2. Die immer wieder neue Anpassung des Lebensstils an die Schichtarbeit belastet Kreislauf und Verdauungssystem. Herzinfarkt und Verdauungsstörungen treten häufiger auf. Das circadiane System kann desynchronisieren oder die Phasenbeziehung ist ungünstig, wechselt oft oder fehlt gänzlich. Mahlzeiten werden nicht eingehalten oder zur falschen Zeit genommen. Während der Nachtarbeit werden oft Süßigkeiten gegessen.
- 3. Der circadiane Rhythmus wird ungünstig beeinflußt: Der normale Ablauf der Tageseinteilung ist Arbeit, Erholung, Schlaf. Die Reihenfolge bei Schichtarbeit ist jedoch oft Arbeit, Schlaf, Erholung. Das dürfte ein Grund für den unterschiedlichen Körpertemperatur-Verlauf zwischen Schichtarbeitern und Tagarbeitern sein. Auch das Muster der Schichtarbeit ist oft ungünstig: Wenn eine neue Schicht gegenüber der alten verfrüht ist, wird das vom circadianen System schlecht toleriert.

Um einige dieser Punkte zu illustrieren: Astronauten wurden auf einen 12-Stunden-Tag trainiert mit 6 Stunden Arbeit, 2 Stunden Erholung und 4 Stunden Schlaf. Am vierten bis fünften Tag traten starke Müdigkeit und vegetative Störungen auf (Dushkov and Komolinskii (1968)). Schiffswachen auf amerikanischen Atom-U-Booten liefen innerhalb eines 18 Stunden Tages ab (Schaefer et al. (1979)). Die Stockholmer Polizei arbeitete nach einem 20h Tag, der sehr schlecht von den Polizisten toleriert wurde (A1 (n.d.)). Alle diese Arbeitszyklen belasteten die Betroffenen extrem. Sie lagen außerhalb des Mitnahmebereichs des cir-



Abbildung 2.17: Verlauf der Körpertemperatur während eines 1-1-1 Schichtplans: Nach einem arbeitsfreien Tag (schwarze Kurve oben links, blaue horizontale Linie repräsentiert Schlafenszeit) ein Tag Frühschicht von 6 Uhr bis 14 Uhr (grüne Kurve, Mitte links), ein Tag Spätschicht von 14:30 bis 22 Uhr (blaue Kurve, unten links) und ein Tag Nachtschicht von 22 Uhr bis 6 Uhr (rote Kurve, oben rechts). Danach zwei Tage arbeitsfrei (schwarze Kurven, Mitte rechts und unten). Körpertemperaturwerte sind aus Daten von vier Versuchspersonen gemittelt. Nach Rutenfranz et al. (1977) D037A/rotation

cadianen Systems<sup>10</sup>. Die Betroffenenen waren häufiger krank. Oder sie quittierten die Arbeit.

Viele schlimme Unfälle wurden durch Menschen verursacht, die gegen ihre biologische Uhr sündigten: Sie waren übermüdet (Reaktorunfälle in Tschernobyl 1986 und Three Mile Island 1979, Challenger-Raumfähre 1986, Tankerunglück Exxon Valdez 1987) oder eingeschlafen (Kentern der Fähre Herald of Free Enterprise vor der belgischen Küste 1987, Auflaufen des japanischen Tankers Matsukaze vor Seattle 1988). Zahlreiche Auto- und Flugzeugunfälle haben gleiche Gründe (Zulley and Knab (2000)).

Wechselschicht scheint besonders belastend zu sein. Es wäre besser, stattdessen eine stabile Schicht zu haben. Sie würde eine dauerhafte und feste Synchronisation des Tagesrhythmus erlauben. Dauerschichten sind jedoch bisher verpönt. Dafür sind eine Reihe von Gründen verantwortlich, unter anderem soziale Benachteiligung. Diese Nachteile der Schichtarbeit könnten aber beseitigt werden. Schichtarbeiter müßten auch mehr Freizeit bekommen. Sie bekommen oft zu wenig Schlaf. So haben zum Beispiel Lokomotivführer nur 6.5 statt 8 Stunden Schlaf. Zwar haben sie mehr Nickerchen ('naps'), zeigen aber trotzdem Schlafmangel. Das zeigt sich daran, daß sie an den freien Tagen länger schlafen.

Die Leistungsfähigkeit wird durch Schichtarbeit herabgesetzt: Die Zahl der Unfälle steigt, die Fehlerquote erhöht sich (Abbildung 2.18). Die Leistungsfähigkeit verläuft übrigens parallel zur Körpertemperatur.

Schichtarbeiter haben eine Reihe von Beschwerden: Sie klagen darüber, daß ihr soziales Leben gestört ist, ihre Gesundheit leidet und die Leistung nachläßt. Die rhythmische Sekretion von Verdauungsenzymen ändert sich. Das



Abbildung 2.18: Auf der y-Achse ist aufgetragen, wie stark die Fehlerhäufigkeit bei 62000 Schichtarbeitern in der Industrie vom Mittelwert abweicht (in %). Nach Bjerner and Swensson (1953). D038/gaszaehler

Schlafen ist gestört. Ein Drittel bis zwei Drittel der Schichtarbeiter schlafen gelegentlich während der Arbeit ein. Das geschieht nicht nur in der Nachtschicht, sondern auch in der Tagund Abendschicht. Der Schlafmittelverbrauch ist hoch.

Neben diesen Folgen eines gestörten (flachen, desynchronisierten) circadianen Rhythmus kommen noch sekundäre Folgen hinzu. Sie sind durch Rauchen, Kaffee und Alkohol bedingt. Die Krebsrate ist erhöht, was sich aber oft erst nach 5 Jahren zeigt. Der Prozentsatz der kranken Schichtarbeiter wird oft unterschätzt, da diejenigen wegfallen, die aus gesundheitlichen Gründen die Schichtarbeit aufgeben (Selbstselektion der Schichtarbeit). Außerdem gehen Schichtarbeiter seltener zum Arzt. Schließlich haben die verschiedenen Schichten auch sehr unterschiedliche Folgen.

Was kann man tun, um die ungünsti-

 $<sup>^{10}22.5</sup>$ bis 26.8 Stunden, allerdings Lichtintensitäts-abhängig

#### 2.10 Schichtarbeit

gen Folgen der Schichtarbeit zu vermeiden oder abzuschwächen? Zunächst einmal eignen sich nicht alle Menschen gleich gut für Schichtarbeit. Jüngere Menschen vertragen sie besser als ältere. Morgentypen vertragen sie schlechter als Abendtypen (Abbildung 2.19).<sup>11</sup> Ferner läßt sich das Umfeld der Schichtarbeit verbessern. So sollte man das Wochenende möglichst im Schichtarbeit-Muster belassen. Wenn man also Abendschichten hat, sollte man auch am Wochenende spät aufstehen und spät schlafen gehen. Soziale Zeitgeber sollten beachtet werden. Andere Zeitgeber sollten ebenfalls in Betracht gezogen werden. Auch der Schlaf ist als Zeitgeber wichtig. Bewährt hat sich ein sogenannter 'Anchor Schlaf' einer bestimmten Länge (Seite 234 in Minors and Waterhouse (1981)). Der restliche Schlaf kann dann zu verschiedenen Zeiten genommen werden (Abbildung 2.20). Andere Wege, um Schichtarbeit zu optimieren, wurden von Akerstedt (1998) diskutiert. Zwar hat man Maschinen und Geräte optimiert, aber leider dem Menschen, der sie bedient, nicht genug Aufmerksamkeit ge $schenkt^{12}$ .

Risikogruppen sollten von Schichtarbeit ausgeschlossen werden. Dazu gehören Personen mit Diabetes, Atem- und Kreislaufbeschwer-



Abbildung 2.19: Morgentypen vertragen Schichtarbeit  $\operatorname{schlechter}$ alsAbendtypen: Bei 129 Pflegekräften einer Klinik wurde festgestellt, zu welchem chronobiologischen Phasentyp sie gehören (obere Kurve; x-Achse: Maß für Phasentyp). Dann wurden diese Personen befragt, wie sie Nachtschicht tolerieren (5 Fragen). Die Ergebnisse (unterer Teil der Abbildung) zeigen, daß Morgentypen Nachtschicht weniger gut tolerieren als Abendtypen (x-Achse: Maß für Phasentyp). Der Korrelationskoeffizient beträgt -0.72. Nach Hildebrandt et al. (1998). D039/schicht-typ

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup>Abendtypen besitzen in der Regel eine größere Amplitude der Körpertemperatur. Sie sind deshalb für Schichtarbeit toleranter, weil sie sich schlechter oder garnicht an die sich ändernden Bedingungen anpassen (Reinberg et al. (1978), Kerkhoff (1985)). Ein Morgentyp dagegen besitzt in der Regel einen circadianen Rhythmus mit einer niedrigen Amplitude. In dieser Situation versucht der Körper, sich an die geänderten Bedingungen anzupassen (?).

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Kein verantwortlicher Manager würde eine Maschine unter Bedingungen laufen lassen, für die sie nicht spezifiziert wurde, da sie dadurch schnell abgenutzt würde, häufiger ausfallen würde und vorzeitig ersetzt werden müßte. Trotzdem nehmen Manager und Arbeiter die physiologischen Kosten von Schichtarbeit als unvermeidlich hin, die die Eigenschaften des circadianen Systems der Menschen nicht berücksichtigen. ´ (Moore-Ede (1986))



Abbildung 2.20: Anker-Schlaf für eine Person, die normalerweise von 24 Uhr bis 08 Uhr Uhr schläft. Arbeitszeit würde dem Anker-Schlaf folgen oder vorausgehen, und eine zusätzliche Schlafperiode könnte zu verschiedenen Zeiten eingefügt werden, wie durch die zweite dunkle Stufe angedeutet. Auf diese Weise werden Störungen des circadianen Rhythmus der Körpertemperatur stark reduziert. Nach Minors and Waterhouse (1981). D040/anchor-sleep

den, Nierenproblemen, Epileptiker, Schizophrene, Depressive.

Ehrenstein (Ehrenstein (n.d.)) hat vorgeschlagen, Schichtarbeit und Nachtarbeit neu zu gestalten. Man müßte Schichtarbeit in einer Art anbieten, daß sie freiwillig gemacht wird. Statt Wechselschicht müßte Dauerschicht eingeführt werden. Die Schichtarbeiter müßten chronohygienisch beraten werden und auf Gefahren hingewiesen werden. Es sollte einheitliche Schichtwechseltermine geben, die an den Schuljahrbeginn gekoppelt werden. Das würde innerfamiliäre Absprachen erleichtern. Wenn sich zu viel oder zu wenig Arbeiter für eine Schicht melden, müßten die Vorgaben entsprechend nachgeregelt werden. Der Wochenlohn sollte gleich sein, aber die Arbeitszeit länger oder kürzer sein. Der circadiane Rhythmus müßte in besonderen Einrichtungen außerhalb des Betriebes an eine neue Schicht angepaßt werden (zum Beispiel mit besonderer Beleuchtung). Das soziale Umfeld müßte so attraktiv gestaltet werden, daß der Schichtarbeiter auch am Wochenende sein Tagesschema beibehält. Bei Spät- und Nachtschicht müßte helles Licht am Tage vermieden werden.

#### 2.11 Jetlag

Jedem Flugreisenden ist der Jetlag bekannt. Er tritt auf, wenn man nach Westen oder nach Osten mehrere Zeitzonen überfliegt und man sich an den verschobenen Tag-Nacht-Wechsel anpassen muß (Abbildung 2.21 und Tabelle 2.1).

Bei Nord-Süd-Flügen fehlt der Jetlag. Hier kommt nur der Stress durch den Flug zum Tragen.

Vom Jetlag sind Flugpersonal *und* Fluggäste betroffen. Für das Flugpersonal ist der Jetlag nicht nur lästig. Ihre Leistungsfähigkeit wird dadurch gemindert und die Sicherheit der Fluggäste gefährdet. Immerhin werden etwa 65% aller Flugzeugunglücke durch Fehler der Piloten oder der Mannschaft verursacht (Moore-Ede et al. (1982), Graeber and et al. (1983)).<sup>13</sup>

Jetlag kommt durch Stress und durch Zeitzonen-Effekte auf das circadiane System zustande. Dabei wird die Amplitude und Phasenlage des circadianen Systems verändert oder es wird vorübergehend intern desynchronisiert. Die Ursachen und Symptome sind denen der Schichtarbeit zu vergleichen.

Welche Konsequenzen es haben kann, daß bei Zeitzonenflügen die Leistungsfähigkeit herabgesetzt ist, wird durch die Verhandlungen von

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup>Fehler bei manueller Kontrolle sind übrigens selten. Meistens sind es Mangel an Wissen, Kommunikationsfehler, falsche Entscheidungen, oder vorhandene Möglichkeiten wurden nicht benutzt. Der heutige Trend zur Autokontrolle senkt die Motivation der Piloten, ein weiterer Schwachpunkt.



Abbildung 2.21: Zeitzonen-Einteilung der Erde. Die Abbildung zeigt die vierundzwanzig Zeitzonen der Erde und die Bezeichnung einiger dieser Zonen. Wenn es also in Deutschland 1 Uhr nachts ist, ist es in Neuseeland 12 Uhr mittags. Zur Umrechnung siehe Tabelle 2.1). Aus einem Taschenkalender. 041zq/zeitzonen

21	22	23	24	1	2	3	4	ro	9	7	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
20	21	22	23	24		7	e S	4	ഹ	9	7	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
19	20	21	22	23	24	-	5	n	4	ы	9	2	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18
18	19	20	21	22	23	24		7	<i>ლ</i>	4	ы	9	2	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16	17
17	18	19	20	21	22	23	24		7	3	4	ъ	9	2	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16
16	17	18	19	20	21	22	23	24		5	e S	4	ъ	9	2	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	-	5	с С	4	ы	9	7	x	6	10	11	12	13	14
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		5	с С	4	ы	9	2	$\infty$	6	10	11	12	13
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	-	5	с С	4	ы	9	2	×	6	10	11	12
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	-	5	с С	4	ഹ	9	2	×	6	10	11
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	-	5	3	4	ഹ	9	2	$\infty$	6	10
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		2	3	4	л С	9	7	8 8	6
6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	<del>, _</del>	5	ۍ ۲	4	2	9	2	8
8	6	10		[2	 	14	ت ت	91	12	<u>8</u>	61	50	21	22	53 53	24		5	ۍ ا	4	л С	9	7
- 2	8	6	0		5	ς Ω	4	ນ	9	2	×,	6	00	11	57		14		5		4	ى ب	9
	2	8	6	0	-	2	1	4	5	6 1	7 1	8	6	0	11	2	сл 63	4		5	ന	4	
	- 	2	~	1	0	1	2 1	3	4 1	5 1	6 1	7 1	8	9	0	1 2	2	3	4		~	~	
						) 1	1	2	.1	1	1	3 1	7 1	1	9	0	1	5	5				4.
4	ю	9	~	x	6	1(	Ξ	1	Ĥ	1	ĩ	1(		16	i	7(	5	5	5	5	1	2	က
3	4	ъ	9	2	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		7
7	က	4	ഹ	9	~	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	-
	7	3	4	ഹ	9	2	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
24	-	2	3	4	ഹ	9	7	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
23	24	1	2	3	4	IJ	9	2	$\infty$	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
22	23	24		2	e	4	ы	9	2	x	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21

Tabelle 2.1: Zeitzonen-Tabelle. Oberste Zeile bezieht sich auf die Zeiten in Abbildung 2.21. 0 (=24Uhr) ist Greenwich Zeit, 9 Tokio, 19 Ost-Amerika. Ist die Zeit an irgendeinem Ort der Erde bekannt, kann die entsprechende Zeit für andere Zeitzonen gefunden werden, indem in den linken oder rechten Reihen nachgesehen wird (Beispiel: Wenn es in Frankfurt 8 Uhr morgens ist, was ist die Uhrzeit in New York? Frankfurt hat Mitteleuropäische Zeit, deshalb die Reihe mit 1 am Kopf zu. Man gehe zur 8 in dieser Reihe, dann so weit nach rechts, bis die Reihe mit der Kopfzahl 19 erreicht ist (Ost-Amerika). Man findet, dass es in New York 2 Uhr morgens ist. 041/zeitzonen

#### 2.11 Jetlag

Dulles 1950 in Ägypten belegt. Der amerikanische Außenminister hatte nachts 6 Zeitzonen nach Osten überflogen und war extrem schlecht mit seiner inneren Uhr an die ägyptische Zeit angepaßt. Bekanntlich wurde das Assuan-Staudamm-Projekt dann von der Sowjetunion übernommen. Diplomaten, Geschäftsleute und Sportler sind also von solchen Zeitzonenflügen besonders stark betroffen.

Für den Passagier, der sich einige Zeit im Land aufhält, zu dem er fliegt, ist die Anpassung einfacher als bei Schichtarbeit, da soziale Zeitgeber im Zielland helfen, sich rasch anzupassen (zuerst von Sharp (1960) beschrieben). Bei längerem Aufenthalt, wie es bei vielen Fluggästen der Fall ist, sollte man versuchen, sich schon vor dem Flug anzupassen, indem man jeden Tag etwa 1-2 Stunden die Phase des circadianen Rhythmus verschiebt. Die Anpassung erfolgt unterschiedlich schnell, je nachdem, wie man sich verhält. Starke Zeitgeber sind der Licht-Dunkel-Wechsel (Daan (n.d.)), die Zeitpunkte und Art der Mahlzeiten<sup>14</sup>, Getränke,  $Medikamente^{15}$  (siehe Abschnitt 20.8), Aktivitäten wie Jogging (Mrosowsky and Salmon (1987)), persönliche Faktoren wie Lebensführung, Motivation<sup>16</sup>, emotionales Verhalten, Berufserfahrung, Routine, geografische und ökologische Faktoren (Klima, Höhe), operationelle Faktoren wie Beginn und Dauer des Dienstes.

Im Gegensatz zu den meisten Passagieren, die sich an die neue Zeitzone anpassen müssen, ist die Situation für das Flugpersonal und für Passagiere, die sich nur kurz im Land des Flugzieles aufhalten, ganz anders. Deshalb muss bei ihnen eine andere Strategie angewandt werden. Sie sollten sich nicht nach dem Zeitzonenflug an die neue Zeitzone.<sup>17</sup>

Es gibt Empfehlungen für Ruhezeiten für das Flugpersonal. Die ICAO (International Civil Aviation Organization) hat eine Formel für Ruhezeiten auf langen Flugstrecken entwickelt, nach der die Ruhezeiten pro 2.4 Stunden (=1/10 Tag) berechnet werden können (Tabelle 2.2). Allerdings sind individuelle Anpassungen nötig. Leider mangelt es noch sehr an detaillier-

Tabelle 2.2: Empfehlungen des ICAO (International Civil Aviation Organization) für Ruhezeiten des Flugpersonal. Formel für Ruhezeiten auf langen Flugstrecken, nach der die Ruhezeiten pro 2.4 Stunden (=1/10 Tag) berechnet werden können:  $R = Rh/2 + (ZZ - 4) + K_{ab} + K_{an}$  wobei R die Ruhezeit pro 1/10 Tag, Rh die Reisestunden, ZZ die Anzahl der überflogenen Zeitzonen,  $K_{ab}$ ein Koeffizient für die Abflugzeit und  $K_{an}$  ein Koeffizient für die Ankunftszeit ist. Diese Koeffizienten lassen sich aus der folgenden Tabelle ablesen:

Ortszeit	8-12	-18	-22	-1	-8
K <sub>ab</sub>	0	1	3	4	3
Kan	4	2	0	1	3

ten Informationen. Wichtig wäre, Körperrhythmen während des Fluges zu registrieren, Schlafnotizen zu machen und die Müdigkeit anzugeben. Daraus könnten Schlüsse gezogen werden, wie Jetlag vermieden oder verkürzt werden kann. Es gibt bisher nur wenige physiologische und biochemische Daten. Solche Untersuchun-

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup>Phasenverschiebungen durch Kombination multipler Zeitgeber. Hoher Proteingehalt der Nahrung fördert Catecholaminsynthese (Wachzeit), hoher Kohlehydratgehalt Serotoninsynthese (Schlafzeit). Methylxanthin enthaltende Getränke wie Kaffee, Tee, Kakao sind ebenfalls chronobiologisch aktive Substanzen (Ehret et al. (1975)).

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup>Jetlag-Pillen: Melatonin (Arendt (1997)), Benzodiazepin (ein Schlafmittel, das GABA im SCN hemmt, Triazolam (Turek (1986)).

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup>Zu viel Aufmerksamkeit wird auf den Piloten gerichtet. Stattdessen sollte die Mannschaft mehr berücksichtigt werden. Gruppendynamik, Führungsstil, Persönlichkeitsstruktur der Mannschaft, Kommunikationsart sind wichtig.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup>Die Aeroflot benutzte bei ihren Piloten Schlaf in vollständiger Isolation und vermied möglichst Nachtflüge.



Abbildung 2.22: Verschiebung von Körperfunktionen nach Flügen nach Osten (obere Kurven für Aktivität (rot), Körpertemperatur (°C, blau), und Kaliumausscheidung im Urin (mg/h, grün. Anpassungen von Körperfunktionen nach Flügen nach Westen (untere Kurven). Flugzeit: rote senkrechte Linien. Nach Wever (1979). D042k/anpassungen-zeitzonen



Abbildung 2.23: Anpassung von Körperfunktionen nach Flügen : Die Kurven zeigen, wie lange es dauert, bis sich verschiedene Körperfunktionen (Aktivität (rot), Körpertemperatur (°C, blau), und Natriumausscheidung im Urin (mg/h, grün) an die neuen Zeitzonen nach Ost- (obere Kurven) und Westflügen (untere Kurven) angepasst haben. Nach Wever (1979). D042/anpassungenzeitzonen

gen können auch am Boden gemacht werden (zum Beispiel Wever (1979), Mills (n.d.)). Auch Simulationen mit Modellen sind hilfreich (Gander et al. (1985), Klein et al. (1970), Johnsson and Fröberg (1974), Gundel and Spencer (1992)). So sind beispielsweise Anpassungen an neue Zeitzonen unterschiedlich, je nachdem, ob man nach Osten oder nach Westen reist (Abbildung 2.22 und 2.23).<sup>18</sup> In einer Publikation wurde berichtet, daß bei Krankheiten von Reisenden Depressionen gehäuft auftreten, wenn sie nach Westen fliegen. Grundlage waren ärztliche Behandlungen am Flughafen von Heathrow bei London (Jauhar and Weller (1982)).

Hier noch einige Vorschläge zu sichereren Flügen: Das Flugpersonal sollte Schlafmittel und Alkohol vermeiden. Es ist bekannt, daß 40% der Stewardessen Schlafmittel nehmen. Sie wirken sich negativ auf den Schlafablauf aus. Es kommt zum Katersymptom ('Hangover'). Abends getrunkener Alkohol erregt, es kommt dann zur Hypnose, Abbau des Alkohols, neue Erregung. Der Schlaf ist unruhig und oberflächlich. Die Schlafverteilung ist gestört, der REM Schlaf stark reduziert, das Allgemeinbefinden verschlechtert sich. Die Effekte können sich in Verbindung mit anderen Medikamenten potenzieren. Autogenes Training hilft, auch für Kurzzeit-Regeneration. Wichtig ist die Motivation, der Wachheitsgrad, die Selbstdisziplin, die Lebensund Schlafhygiene. Eine gute Selbstbeobachtung ist nötig. Auch kurze Schlafzeiten (6 Stunden) genügen zur Regeneration. Der Schlaf sollte bei kurzen Flügen in Isolation erfolgen, sodaß die Zeitgeber am Zielort keine Effekte haben. Auf diese Weise bleibt man in seiner Körperzeit.

#### 2.12 Medizinische Aspekte.

In den vorausgegangenen Abschnitten hatten wir bereits im Zusammenhang mit Schichtarbeit und Jetlag einige medizinische Aspekte kennengelernt, bei denen circadiane Rhythmen gestört waren und die Gesundheit beeinflußt wurde. Auch Schlafstörungen gehören dazu. Wir werden in diesem Abschnitt auf weitere Zusammenhänge eingehen.

Da die Empfindlichkeit des Körpers auch auf viele Arzneimittel tagesperiodisch schwankt, ist es nicht gleichgültig, wann man Medikamente zu sich nimmt. Das ist bei Medikamenten besonders wichtig, die auch eine toxische Wirkung haben, wie zum Beispiel in der Krebstherapie. Da müssen Zeiten gefunden werden, in denen das Medikament wenig toxisch, aber möglichst stark gegen den Krebs wirkt. Anästhetika, Analeptika, Corticosteroide, anabolische Steroide, Histamine und Alkohol sind weitere Beispiele für Substanzen, deren Wirkung tagesperiodisch schwankt. Die Chronopharmakologie ist inzwischen ein selbständiges Arbeitsgebiet geworden und ihre Ergebnisse müssen von Medizinern bei Verschreibungen von Medikamenten und Behandlungen beachtet werden (Lemmer (1996), Hildebrandt et al. (1998)). Auch bei Operationen spielen tagespe-

 $<sup>^{18}\</sup>mathrm{Wever}$  (1979) simulierte Transkontinentalflüge in einem Bunker. Die Versuchspersonen wußten davon nichts und es wurde ihnen auch nicht bewußt. Bei diesen Versuchen dauerte die Anpassung bei Flügen nach Westen länger als bei Flügen nach Osten. Bei Flügen nach Osten waren die Amplituden um 53% reduziert, während das  $\alpha/\rho$ -Verhältnis unbeeinflußt blieb. In einem Fall gab es auch eine 18 stündige Verzögerung statt einer 6 stündigen Verfrühung. Das Zeitverhalten der Verschiebungen ist je nach dem beobachteten Zeiger unterschiedlich: Der Aktivitätsrhythmus braucht nur 2 bis 3 Tage, während die Körpertemperatur 6 und mehr Tage benötigt. Die Anpassungsgeschwindigkeit ist auch von der Oszillatorstärke abhängig. Die Leistungsfähigkeit ist nach Vorverschiebungen des Rhythmus niedriger, nach Verzögerungen nicht. Das stimmt mit experimetellen Flugergebnissen überein. Nicht damit stimmt überein, daß im Bunkerversuch die advance transients kürzer sind als die delay transient. Es stimmt aber mit Wever's Modell und seinen Tierversuchen überein. Es hängt nicht von der Reihenfolge der Flüge ab und auch nicht von der Tageszeit (Klein and Wegmann (1972)). Vielleicht ist dabei die Zeitgeberstärke von Bedeutung oder der Stress des Fluges.

riodische Änderungen der Empfindlichkeit eine Rolle. Schmerz wird zu verschiedenen Tageszeiten unterschiedlich stark empfunden (Jores and Frees (1937)). Am stärksten sind Schmerzen gegen 18 Uhr, nachts und morgens sind sie schwächer. Da das Schmerzempfinden zentral geregelt ist, sollten schmerzhafte Eingriffe zum Beispiel bei Zahnbehandlungen morgens gemacht werden. Allerdings ist dann die Leistungsfähigkeit der Zahnärzte nicht optimal (sondern erst nachmittags).

Endogen Depressive<sup>19</sup> haben gegenüber gesunden Menschen niedrigere Konzentrationen der Monoamine Serotonin und Noradrenalin im Gehirn. Die Dichte der Noradrenalin-Rezeptoren im Cortex ist kompensatorisch erhöht. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse ist dereguliert, weil durch (genetische erhöhten Stress Disposition, Probleme in der Kindheit) mehr CRF ausgeschüttet wird. Als Folge davon wird mehr Cortison ('Kampf-Flucht-Hormon') gebildet (Nemeroff (1998)) (Abbildung 2.13). Es gibt eine Reihe von Hinweisen, daß das circadiane System bei endogenen Depressionen beteiligt sein könnte (siehe Unterabschnitt 2.12.3, Halaris (1987)). Es wurde vermutet, daß dabei ein Teil des circadianen Systems einen zu schnellen Rhythmus zeigt. Dadurch kann er nicht wie die anderen Rhythmen auf den 24h Tag synchronisiert werden.

#### 2.12.1 Chronopharmakologie

Otto Loewi entdeckt die chemische Übertragung von Nervenimpulsen in einem Traum 1920. Am nächsten Morgen hatte er die Details vergessen. In der nächsten Nacht hatte er den gleichen Traum. Um zu vermeiden, daß er wieder die Einzelheiten vergaß, führte er das Experiment gleich nachts um 3 Uhr in seinem Labor durch: Er stimulierte den Vagusnerven eines Spenderherzens und zeigte, daß dadurch auch in einem Empfängerherz der Herzschlag verlangsamt wurde. Hätte er die Untersuchung zu einer anderen Zeit gemacht, wäre der Unterschied viel geringer oder gar insignifikant gewesen, da dieser Vorgang tagesperiodisch moduliert wird. Zusammen mit Henry Dale erhielt er für seine Entdeckung 1936 den Nobelpreis.

Der Körper reagiert auf von außen angebotene Substanzen je nach Tageszeit sehr unterschiedlich. Die schmerzstillende Wirkung von Novalgin zum Beispiel schwankt tagesperiodisch (Abbildung 2.24). Die Antihistamin-Wirkung



Abbildung 2.24: Die schmerzstillende Wirkung von Novalgin (Prozent des Tagesmittels) ist am Morgen und frühen Nachmittag größer als am Abend und in der Nacht. Nach Hildebrandt et al. (1998). D043/novalgin

hält 15-17h an, wenn das Medikament um 7 Uhr gegeben wird, aber nur 6-8 h, wenn es um 19 Uhr gegeben wird (Reinberg and Sidi (1966)). Digitalis wirkt nachts doppelt so stark wie am Tage, Glucocorticoide sind am Tage wirksamer als nachts und haben weniger Nebeneffekte. Aspirin, Appetitzügler, Schlafmittel (Barbiturate), Amphetamine, Endotoxine, Gifte, aber auch Röntgenstrahlen wirken zu un-

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup>5-12% der Männer und 10-20% der Frauen in den USA hatten mindestens einmal im Leben eine schwere depressive Episode, die Hälfte dieser Menschen mehr als einmal. 30800 Personen nehmen sich jedes Jahr in den USA das Leben. Die Kosten beliefen sich 1992 auf 43 Milliarden Dollar.

terschiedlichen Tageszeiten gegeben verschieden. Die optimale Zeit für Medikamente gegen cardiovasculäre, endokrine und andere Störungen hängt ebenfalls von der Tageszeit ab. Medikamente gegen niedrigen Blutdruck sollte man morgens nehmen, wenn der Druck am niedrigsten ist. Medikamente gegen hohen Blutdruck dagegen sollten abends genommen werden, wenn der Druck am höchsten ist.

Die Toxizität von Medikamenten kann stark schwanken. Neostigmin hat während der Dunkelperiode eine um 50% höhere Toxizität als am Tage. Ein Chemotherapeutikum gegen Krebs, Cytosin-Arabinosid, hat weniger toxische Nebenwirkungen, wenn es zu verschiedenen Tageszeiten in unterschiedlicher Menge gegeben wird statt der früher üblichen gleichen Dosierung alle 3 Stunden (Haus and Halberg (1972)) Man kann und soll also den Zeitpunkt für Medikamente optimieren. Unerwünschte Nebeneffekte des Nebennierenrindenhormons und synthetische Corticosteroide können durch eine richtige zeitliche Gabe reduziert werden: In diesem Fall wäre das zur Zeit des Aufwachens. Dann ist die Nebennierenrinden-Sekretion maximal. Auch beim Testen von Pharmaka muß die Tageszeit berücksichtigt werden. Eine hohe Variabilität bei Untersuchungen der Wirkung von Pharmaka ist zum Teil durch solche tagesrhythmischen Unterschiede bedingt.

Andererseits beeinflussen Medikamente auch den Tagesrhythmus. Quiadon, ein Beruhigungsmittel, das aber die Aktivität und Leistung erhöht, ist dafür ein Beispiel (Simpson et al. (1973)). Auch Melatonin wirkt auf den Tagesrhythmus (Abbildung 3.15 und Lewy et al. (1992)). Man kann sich mit Hilfe dieser Medikamente bei Reisen und Schichtarbeit rascher an Phasenverschiebungen anpassen. Denkbar ist auch eine Chronotherapie, bei der nur bestimmte Rhythmen manipuliert werden, während andere unbeeinflußt bleiben. Wenn interne Desynchronisation Ursache bestimmter Krankheiten wäre, könnte durch solche Pharmaka die normale Phasenbeziehung wiederhergestellt werden.

Weiterführende Literatur siehe Reinberg (1974), Reinberg and Smolensky (1983), Lemmer (1996).

#### 2.12.2 Jahreszeitlich bedingte affektive Krankheiten (Seasonal Affective Disorders, SAD) und Lichttherapie

Neben endogenen Depressionen gibt es auch Depressionen, die als 'Seasonal Affective Disorders' (SAD) bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um eine Krankheit, die weniger belastend und auffällig ist als endogene Depressionen. Ihre Verbreitung wird stark unterschätzt, weil die Betroffenen selten den Arzt aufsuchen. Beschrieben wurde sie 1982 Rosenthal et al. (1984). Die Krankheit beginnt im späten Herbst und Winter (Oktober bis Dezember auf der nördlichen Halbkugel) und am Ende des Frühlings (März). Meistens handelt es sich um eine milde Depression, es gibt aber auch schwere Fälle. Diese Depression ist vom Breitengrad abhängig. Man findet sie häufig bei Personen, die in höheren Breitengraden in der nördlichen und südlichen Hemisphäre leben (Teng et al. (1995)). Folgende Symptome sind vorhanden: Die Aktivität der Patienten ist reduziert, sie gehen früher schlafen und stehen später auf, ihr Schlaf ist also verlängert. Die Schlafstruktur ist verändert: Die Latenz ist länger, die REM Dichte erhöht, der Deltaschlaf verringert. Bei der täglichen Arbeit leiden sie unter Konzentrationsschwäche. Sie sind kontaktarm. Das neuroendokrine System ist aber im Gegensatz zu typischen Depressiven normal.

Im Winter zeigen sie Lichthunger (Wehr and Rosenthal (1989), Lam and Levitt (1999)). SAD Patienten reagieren empfindlicher auf Änderungen in der natürlichen Tageslänge (Guillemette et al. (1998)). Im Winter sind sie besonders empfindlich auf Licht (Terman and Terman (1999)). Es wurde vorgeschlagen, daß SAD durch Änderungen in der Photoperiode induziert wird und daß die Dauer der Melatoninsekretion die Wirkung der Photoperiode auf das Verhalten bestimmt (siehe Wehr (2001) und Abschnitt 13.6). Die Wirkungen scheinen in höheren Breiten ausgeprägter zu sein (Übersichtsartikel Lam and Levitan (2000)). Bei 60%der Patienten hat eine Therapie mit hellem Licht im Winter Erfolg bei der Behandlung von SAD (Terman et al. (1998)). Die Wirkung geht über die Augen (Wehr et al. (1987)). Es wird angenommen, daß die Lichttherapie bei SAD-Patienten über Melatonin wirkt. Das Melatoninmuster unterscheidet sich bei Patienten im Sommer und Winter, während es bei Gesunden gleich ist (Wehr et al. (2001)).

Verschiedene Lichttherapien wurden angewendet. Bei einer Methode werden die Patienten mit Licht von 25000 Lux 3 Stunden vor Sonnenaufgang und am Abend vor dem normalen schlafen gehen behandelt. Die Depression bessert sich nach 2 bis 4 Tagen. Der gleiche Effekt wurde durch eine einstündige Belichtung mit 1000-2000 Lux zwei Stunden vor dem normalen Aufwachen erreicht. Licht am Abend ist ebenfalls wirksam. Es gibt aber auch Berichte von Experimenten, die für einen Placeboeffekt des Lichtes sprechen. Es gab keine signifikanten Unterschiede im Effekt von schwachem (30, 400 Lux) und starkem Weisslicht (6000 Lux) und zwischen schwachem Rotlicht und starkem Weisslicht, welches SAD Patienten am Morgen verabreicht wurde (Rosenthal et al. (1993), Joffe et al. (1993), Teicher et al. (1995)). Es scheint auch keinen Unterschied zu geben zwischen Bestrahlungen am Morgen, mittags oder am Abend (Lewy et al. (1998), Meesters et al. (1995), Thalen et al. (1995)); siehe jedoch Leibenluft et al. (1996). Die Behandlungen sollten mindestens eine, möglichst aber drei Wochen dauern (Eastman et al. (1998)). Simulation von Dämmerung verbessert die Wirkung der Lichtbehandlung (Meesters (1998)). Die Lichttherapie scheint am besten im unteren Bereich hoher Temperaturen zu wirken.

Eine andere Form von SAD ist bekannt, bei der die Patienten im Sommer depressiv werden (Wehr and Rosenthal (1989)). Sie wurde längst nicht so gut untersucht wie die Winter-SAD. Sommerdepressionen kommen in *geringeren* Breitengraden häufiger vor. Es wurde vorgeschlagen, daß hohe Temperatur und nicht die Photoperiode für diesen Typ von SAD zuständig ist (Lam and Levitt (1999)). Da sich das jahreszeitliche Muster der Reproduktion des Menschen und SAD ähneln, könnten beide eine gemeinsame biologische Ursache haben.

Interessanterweise liegt die Haupt-Konzeptionszeit für Kinder von SAD-Patienten im Spätsomme (eine Studie an 219 Patienten in den Vereinigten Staaten), während sie sonst im Dezember ist. SAD wurde deshalb als ein Überbleibsel einer seasonalen Reproduktion angesehen (Pohl and Giedke (1987)). In menschlichen Gemeinschaften war es vorteilhaft, sich in Zeiten knapper Nahrungsresourcen zurückzuziehen, keine Kinder zu bekommen und den Energieverbrauch einzuschränken. All das sind auch Symptome von SAD-Patienten. Eskimofrauen menstruieren auch heute noch nicht während des Winters.

Was ist das besondere von SAD? Handelt es sich dabei um eine Störung der Synchronisation des circadianen Systems?<sup>20</sup> Oder ist das circadiane System geändert, beispielsweise desynchronisiert, mit veränderter Amplitude oder einer Phasenlage, die früher oder später liegt als bei der Norm (Bunney and Bunney (2000), Koorengevel et al. (2000), Thompson et al. (1997))? Die Lichttherapie (Lam et al. (1997), Partonen and Lonnqvist (1996)) oder natürliches Licht (Wirz-Justice et al. (1996)) würde in diesem Falle den Rhythmus neu anstossen oder resynchronisieren.

Ferner scheint bei SAD Patienten das sero-

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup>Weist zum Beispiel die Retina der SAD Patienten Besonderheiten auf? Oder sind soziale Zeitgeber zu schwach, um bei diesen Patienten den Rhythmus zu synchronisieren?

tonerge System des Gehirns gestört zu sein (Schwartz et al. (1998), Neumeister et al. (1997)). Mit Serotonin-Aufnahme-Hemmern kann SAD wirksam therapiert werden (Thorell et al. (1999)). Allerdings wirken weder Licht noch Serotonin-Aufnahme-Hemmer bei besonders kranken Patienten (Schwartz et al. (1996a)).

Die Melatoninkonzentration im Blut von SAD-Patienten ist im Winter anders als im Sommer. Möglicherweise reicht bei SAD -Patienten die Beleuchtung im Herbst und Winter nicht aus, um Melatonin zu unterdrücken.

Viele Fragen zur Beziehung zwischen Licht, SAD und der circadianen Uhr bleiben unbeantwortet (siehe Levitt et al. (1996), Lee et al. (1997), Meesters et al. (1999)). Mehrere Typen des SAD sind bekannt. Bei einigen ist die Reaktion auf Licht nur gering (Terman et al. (1996)). Für spezielle Literatur zu SAD siehe Neumeister et al. (1998), Wirz-Justice and Graw (1999), Zulley and Wirz-Justice (1998) und zwei Artikel in Touitou (1998). Zur praktischen Anwendung der Therapie siehe Lam and Levitan (2000), Lam et al. (1997), Rosenthal and Oren (1995) und Dalgleish et al. (1996).

#### 2.12.3 Endogene Depressionen und Lithium-Salze

Im Vergleich zu SAD sind endogene Depressionen sehr viel schwerer. Die Patienten fühlen sich traurig, ohne Hoffnung, sind pessimistisch, fühlen sich schuldig, sind oft auf sich selbst bezogen und vermeiden sozialen Kontakt. Energie, Aktivität und Libido sind verringert, Konzentrationsfähigkeit und Gedächtnis beeinflußt, der Schlaf gestört (siehe Seite 439).

Nach einer Hypothese werden sie durch Störungen der Kopplung der beiden Oszillatoren des circadianen Systems bedingt: Sie sind außer Phase. Ursache für die gestörte Phasenbeziehung soll nach Kripke (1984) ein zu schneller Oszillator (Periodenlänge nur 21.8 Stunden) sein. Dadurch wird das Schlafmuster gestört, das Körpertemperatur-Maximum liegt früher. Die Depression tritt ein, wenn das Maximum der Körpertemperatur nach Mitternacht liegt. Manien treten auf, wenn das Maximum nachmittags oder abends liegt. Die Schlafdauer hängt davon ab, in welcher Phase der Schlaf beginnt. Sie ist kurz, wenn der Schlaf im Minimum der Körpertemperatur beginnt. Sie ist lang, wenn er im Maximum beginnt. Bei normalen Menschen sind Depressionen und Schlafmuster-Anomalien induzierbar, wenn sie ab 10 Uhr schlafen müssen.

Endogene Depressionen lassen sich behandeln, wenn der Schlaf um mehrere Stunden verfrüht beginnt. Körpertemperatur-Rhythmus und Schlaf-Wach-Rhythmus sind dann wieder miteinander synchronisiert. Auch die Krankenberichte vom Flughafen Heathrow (Jauhar and Weller (1982)) sprechen dafür.

Endogene Depressionen werden auch erfolgreich mit Li<sup>+</sup>-Salzen behandelt. Diese Salze verlangsamen bei verschiedenen Organismen die circadiane Uhr. Es wurde vermutet, daß sie bei der Therapie von endogenen Depressionen des Menschen ebenfalls auf das circadiane System wirken. Deshalb untersuchten wir in einem Experiment in Spitzbergen (dort herrschen im Sommer Dauerlicht-Bedingungen), ob Li<sup>+</sup>-Salze den circadianen Rhythmus des Menschen verlangsamt (siehe das Spezialthema unter Abschnitt 20.11 und Halaris (1987)). Das bestätigte sich (Johnsson et al. (1979, 1980)). Es wurde spekuliert, daß Li<sup>+</sup>-Salze die Kopplung von Oszillatoren im circadianen System beeinflussen (Engelmann et al. (1983)). Später wurde auch bei Affen nachgewiesen, daß Li<sup>+</sup>-Salze den circadianen Rhythmus verlangsamen (Welsh and Moore-Ede (1990)).

Manisch-depressive Patienten, besonders Frau-

en, sind auf Licht überempfindlich. Auch Depressionen sind unter Frauen häufiger. Vielleicht brauchen Frauen mehr Licht zur Synchronisation des Rhythmus (A6 (n.d.)).

Es wurde in einer ethologischen Hypothese vorgeschlagen, die Geisteskrankheit Schizophrenie als Nocturnalismus aufzufassen (Feierman (1982)). Darüber mehr in einem Spezialthema (Unterabschnitt 20.10).

## Kapitel 3

# Uhren von Nagern, ihre Zeiger und wie diese gestellt werden

Nager besitzen eine Reihe von Vorteilen, um an ihnen circadiane Rhythmen zu untersuchen. Es wird erklärt, wie Zeitgeber wie zum Beispiel der Licht-Dunkel-Wechsel diese Rhythmen synchronisieren, wie dieses Licht perzipiert wird und Signale an circadiane Zentren weitergeleitet werden. Mutanten helfen, Licht auf die Mechanismen zu werfen, die den circadianen Rhythmen zugrunde liegen. Die Bedeutung des SCN und des Pinealorgans mit seinem Hormon Melatonin für die Kontrolle circadianer Rhythmen wird aufgezeigt. Als Beispiel circadianer Rhythmen dienen die lokomotorische Aktivität, der Schlaf-Wach-Zyklus, das 'disk shedding ´ in der Retina der Augen und andere Vorgänge. Ereignisse, die von der circadianen Uhr kontrolliert werden, können auf die Uhr zurückwirken. Der Rhythmus kann ferner durch andere Ereiqnisse maskiert werden. Ausserdem lässt er sich auf verschiedene Weise beeinflussen. Die indische Feldmaus Mus booduga wird als ein interessantes Versuchstier vorgestellt. Viele Fragen zur circadianen Kontrolle bei Mäusen sind noch offen.

Beschwerde-Kasten: Dieses Kapitel ist ziemlich schwach. Es wäre gut, wenn es von jemandem neu geschrieben wird, der damit vertrauter ist. Abbildungen zum Illustrieren wichtiger Dinge fehlen zum Teil noch

#### 3.1 Einführung

Nager stehen wie auch andere Säuger unter der Kontrolle circadianer Uhren. Es gibt mehrere Gründe, warum sie sich recht gut eignen, um circadiane Rhythmen zu untersuchen. Als kleine Tiere sind sie leicht in größerer Zahl im Labor oder in Klimakammern zu halten. Sie vermehren sich rasch. Ihre Physiologie und ihr Verhalten sind eingehend untersucht. Man kann an ihnen genetische Untersuchungen durchführen und es gibt zahlreiche Mutanten. Ihre lokomotorische Aktivität und ihre Körpertemperatur schwanken tagesperiodisch. Mit Laufrädern oder Wackelkäfigen läßt sich die Aktivität über lange Zeiträume hinweg zuverlässig messen (Abbildung 3.1, Beau (1992)). Die Körpertemperatur kann telemetrisch durch peritoneal implantierte Sonden registriert werden. Der Schlaf kann durch EEG-Messungen verfolgt und charakterisiert werden.

Diese Rhythmen werden durch den Licht-



Abbildung 3.1: Hamsterkäfig mit Laufrad zum Messen der lokomotorischen Aktivität. Links Ansicht von vorn, rechts Seitenansicht. Wasserversorgung über ein Glasrohr mit Nippel, Futterversorgung über ein Glasrohr mit Pellets. An der Achse ist ein Magnet exzentrisch befestigt, der beim Drehen des Laufrades einen Magnetschalter schließt. Jeder Schaltvorgang wird registriert und in bestimmten Zeitabschnitten (zum Beispiel alle 10 Minuten) die Häufigkeit über einen Rechner gespeichert. Die Daten werden dann als Histogramm in einem sogenannten Aktogramm gespeichert (Beispiel in Abbildung 3.8). E044A/Laufrad

Dunkel-Wechsel synchronisiert. Unter konstanten Bedingungen läuft der Rhythmus frei. Lichtpulse verschieben ihn. Stämme und Mutanten zeigen unterschiedliche Periodenlängen dieses Freilaufs. Verschiedene Behandlungen und Substanzen können die Periode ebenfalls beeinflussen.

An Nagern wurden auch die Zentren untersucht, die für circadiane Rhythmen verantwortlich sind.

Mäuse, Hamster und Ratten sind bevorzugte Untersuchungsobjekte. Wir werden uns im folgenden exemplarisch vor allem mit Rhythmen bei Mäusen beschäftigen. Zunächst soll der Weg verfolgt werden, auf dem der Licht-Dunkel-Wechsel und andere Zeitgeber der Umwelt den circadianen Oszillator synchronisieren. Dann wird die Lokalisation und Physiologie der circadianen Uhr im suprachiasmatischen Kern des vorderen Hypothalamus des Gehirns besprochen. Seit einiger Zeit sind Mutanten bekannt, deren circadiane Uhr geändert ist. Sie lassen sich verwenden, um den Mechanismus verstehen zu lernen. Wie vom SCN verschiedene Vorgänge gesteuert werden, wird als nächstes gezeigt. Beispiele dafür werden vorgestellt.

## 3.2 Synchronisation des Oszillators durch Zeitgeber

Die Synchronisation der circadianen Uhr der Säuger geschieht vor allem durch den Licht-Dunkel-Wechsel der Umwelt. Das Licht wird über die Retina der Augen wahrgenommen. Dabei sind sowohl die Stäbchen als auch die Zäpfchen beteiligt, aber wohl noch eine weitere Komponente, die noch nicht bekannt ist. Blinde Nager lassen sich nicht durch einen Licht-Dunkel-Wechsel synchronisieren, sondern zeigen Freilauf (siehe Unterabschnitt 20.14). Es gibt Mutanten, deren Retina degeneriert ist (rd, rds). Ihr circadianer Rhythmus wird aber trotzdem noch durch Licht phasenverschoben. Allerdings sind diese Tiere dabei weniger Licht-empfindlich als der normale Ausgangsstamm CBA/N. Entweder sind nur sehr wenige Zäpfchen ohne äußere Segmente für die Lichtperzeption verantwortlich, oder es gibt dafür bisher unbekannte Zellen in der Retina. Auch UV-empfindliche Zäpfchen (Reste) sind beteiligt (Foster et al. (1991), Foster et al. (1993), Provencio et al. (1994)).

Retinale Ganglienzellen projizieren über einen besonderen Weg, den retinohypotalamischen Trakt (RHT), zum SCN (Abbildung 3.2 und 3.14). Die beiden anderen Nervenstränge vom Auge zum Gehirn, der optische Nerv und das akzessorische optische System, beeinflussen die Synchronisation nicht. Der retinohypothalamische Trakt wurde durch autoradiografische Methoden entdeckt (Moore and Lenn (1972)).

Neuronale Signale (Glutamat als Neurotransmitter) gelangen zum SCN und synchronisieren die Schrittmacher (siehe Abbildung 3.12).

Das circadiane System wird ausserdem durch andere Teile des Gehirns kontrolliert. Werden zum Beispiel die olfaktorischen Lappen entfernt, verlängert sich die Periode des Aktivitätsrhythmus um 43 Minuten. Die Aktivität beginnt 108 Minuten später (Possidente and X (1990)).

Das intergenikulate Blatt (IGL) erhält retinale Eingänge und sendet Afferente zum SCN. IGL-Läsionen bei Mäusen verlängern die Periode des Laufrad-Rhythmus im Dauerdunkel, während sie im Dauerlicht unverändert bleibt. Das IGL hat also einen endogenen Einfluß auf das circadiane System des SCN (Pickard (1994)).

Bei der Synchronisation des circadianen Rhythmus im SCN durch Lichtsignale spielen Transkriptionsfaktoren eine Rolle (siehe Abbildung 3.3). Die genaue Rolle von c-Fos ist aber noch nicht völlig bekannt (Schwartz et al. (1996b)). Bei der circadianen Steuerung ist auch NO beteiligt (Wang and Morris (1996)): Im SCN der Maus reagieren Zellen immunoreaktiv auf NO.



Abbildung 3.2: Visuelle Wege von den Augen zum Gehirn beim Hamster. Licht wird über die Retina der Augen wahrgenommen. Die Signale werden über den primären optischen Trakt (primäre visuelle Eingänge zum visuellen Cortex über die lateralen geniculaten Kerne (LGN) und über optische Radiationonen), das akzessorische optische System (AOS, diffuse Projectionen zu verschiedenen Gebieten des Hirnstammes) und den retinohypothalamischen Trakt (RHT) zum Gehirn weitergeleitet. Der RTH endet im suprachiasmatischen Kern (SCN). Dieser enthält 'Schrittmacher' Zellen für die circadiane Rhythmik. Nach Moore-Ede et al. (1982). E044Bv/lichtsyn-scn

NO scheint beim Übertragen Licht-induzierter Signale im SCN eine Rolle zu spielen. Auch Serotonin ist bei der Wirkung des Lichtes auf den circadianen Oszillator im SCN beteiligt (Bradbury MJ (1997), Prosser et al. (1993), Edgar et al. (1993b)).

Nicht nur Licht, sondern auch Aktivität der Tiere synchronisiert ihren circadianen Rhythmus. Wird den Tieren für zwei Stunden pro Tag ein Laufrad angeboten, hat unter sonst konstanten Bedingungen der Rhythmus der Tiere eine Periodenlänge von genau 24 Stunden. Er ist also synchronisiert. Die lokomotorische Aktivität erhöht den Serotoningehalt im SCN. Serotonin-Agonisten verschieben die Phase der circadianen Uhr in gleicher Weise wie lokomotorische Aktivität. Möglicherweise sind also serotonerge Afferenzen Teil des Aktivitäts-abhängigen Synchronisationsmechanismus (Edgar et al. (1991a), Edgar et al. (1991b), Edgar and Dement (1991)). Auch wenn die Nahrung auf eine bestimmte Zeit des Tages beschränkt wird oder die Tiere mit elektrischen Reizen gestreßt werden, gibt es Synchronisation des circadianen Rhythmus (Tamagawa (1993)).

## 3.3 Beinflussung des circadianen Systems, Alterseffekte

Das circadiane System der Maus läßt sich beeinflussen. die Pe-Ostrogen verkürzt riodenlänge  $\operatorname{im}$ Dauerlicht. Wenn der hoch Wachstumshormon-Spiegel dauernd ist (bei einer transgenen Maus), wird ebenfalls die Periode im Dauerlicht kürzer (Ferraro et al. (1994)). Serotonin scheint ebenfalls die Periodenlänge der circadianen Uhr zu beeinflussen (Possidente and X (1992)).

Außerdem ändert sich das circadiane System mit dem Altern der Tiere. Es reift und stabi-

lisiert sich vom Jungtier zum Adulttier (Weinert and Weiss (1997)). Im Dauerdunkel verlangsamt sich bei Mäusen die Periode der Laufradaktivität mit dem Alter (Possidente et al. (1995), Mayeda et al. (1996)), während sie sich bei anderen untersuchten Nagern verkürzt (Possidente et al. (1995)). Mit dem Alter wird das circadiane System weniger empfindlich auf synchronisierendes Licht (Benloucif et al. (1997)).

#### 3.4 Circadiane Zentren

Das circadiane System der Säuger besteht aus Multioszillatoren, die hierarchisch und nicht-



Abbildung 3.3: Oben: Lichtpulse werden über die Retina der Augen perzipiert und als Signal ans SCN weitergeleitet. Dort verschiebt es die Phase der circadianen Oszillatoren und als Folge davon den lokomotorischen Aktivitätsrhythmus (schwarze horizontale Balken für jeden Tag, rote Markierung: Lage des Lichtpulses, der den Rhythmus nach vorn verschiebt). Darunter: Signalübertragungskaskade zur Synchronisation von Hamstern durch Licht-Dunkel-Zyklen. Ein äusserer Reiz (ein Neurotransmitter oder ein Hormon aktiviert ein second messenger System (cAMP, Ca<sup>2+</sup>). Dadurch werden cAMP response element binding Proteine (CREB) phosphoryliert. Das ist Voraussetzung dafür, um immediate early genes (IEGs) wie c-fos und junB zu aktivieren. Transkription ( $\rightarrow$ mRNA) und Translation ( $\rightarrow$ c-Fos, JunB) bilden Proteine der Fos oder Jun Familie. Sie fügen sich zu Heterodimeren zusammen und kombinieren mit der AP-1 Region anderer Genabschnitte. Damit wird ihre Transkription gefördert oder gehemmt. Nach Wollnik (1995). E044B/lichtsyn-scn



Abbildung 3.4: Anatomie des Pinseläffchen-Gehirns als Sagittalschnitt (oben) und als Coronalschnitt (unten). Der paarige suprachiasmatische Kern (SCN) liegt lateral an der vorderen Spitze des dritten Ventrikels über dem optischen Chiasma. Nach Moore-Ede et al. (1982). E044Cn/scn-uhr

hierarchisch angeordnet sind.<sup>1</sup> Wie bei anderen Vertebraten liegt ein Zentrum der circadianen Steuerung in den paarigen SCN im vorderen Teil des Hypothalamus (Abbildung 3.4). Zur Geschichte der Entdeckung und neuere Ergebnisse siehe Weaver (1998). Richter zerstörte verschiedene Hirnregionen und Hirndrüsen der Ratte (Richter (1965), Richter (1967)) und fand Arhythmie, wenn Bereiche im Hypothala-

- Nach Phasenverschiebungen (beispielsweise nach Zeitzonenflügen) werden die verschiedenen circadianen Rhythmen unterschiedlich schnell resynchronisiert. Der circadiane Aktivitätsrhythmus, die Fress-, Trink- und Temperaturrhythmen passen sich schneller an als Urinparameter ('Übergangs-Desynchronisation')
- Beim Menschen kommt es unter konstanten Bedingungen zu spontaner interner Desynchronisation
- Bei erzwungener interner Desynchronisation ist der Mitnahmebereich für die verschiedenen circadian gesteuerten Vorgänge unterschiedlich. Wahrscheinlich werden dabei multiple untergeordnete Rhythmen vorübergehend von übergeordneten Zentren entkoppelt.
- Interne Dissoziation ('Splitting') im Dauerlicht weist auf zwei gegenseitig gekoppelte Oszillatoren hin. Sie sind in Antiphase, also 180<sup>0</sup> gegeneinander verschoben. Das wurde bei Hamstern, Ratten, Mäusen, Eichhörnchen, Baumhörnchen, Affen, aber auch bei Staren und Eidechsen beobachtet. Es ist noch unbekannt, ob das durch unterschiedliche Oszillatoren im SCN zu Stande kommt oder durch Oszillatoren außerhalb des SCN. Vielleicht ist der SCN für interne Interaktionen der Neuronen und ihre Kommunikation spezialisiert.
- circadiane Rhythmen wurden in isolierten Geweben, Organen und Drüsen beobachtet (Nebennierenrinde, Leber, Herz, Erythrozyten, Eingeweide ?)
- Cortisol synchronisiert Urin-Parameter, aber nicht den Freß- und Trinkrhythmus
- Werden diskrete neurale Gewebe zerstört, erlöschen bestimmte circadiane Rhythmen, während andere intakt bleiben (Fuller (1981)).

mus ausgeschaltet wurden. Schon davor war bekannt, daß der Östruszyklus beeinflußt wurde, wenn die SCN zerstört wurden. Diese Ergebnisse wurden von Moore and Eichler (1972) und parallel dazu von Stephan and Zucker (1972) wiederentdeckt

Bei Säugern wird das circadiane System vom SCN beherrscht. Es dient als ein Hauptoszillator und kontrolliert eine große Zahl physiologischer Vorgänge und Rhythmen im Verhalten. Dazu gehören unter anderem lokomotorische Aktivität, Schlaf-Wach-Zyklus, Thermoregulation, Torpor, Winterschlaf, Funktionen des Kreislaufs und viele endokrine Vorgänge. Auch die Synthese und Sekretion des Melatonins wird vom SCN gesteuert.

Werden die SCN zerstört, fällt die circadiane Steuerung dieser Vorgänge weg. Es handelt sich beim SCN nicht um ein Gewebe, welches die Informationen über den Licht-Dunkel-Wechsel vom Auge zu einem Oszillator weiterleitet. Dann hätte seine Zerstörung zwar die Synchronisation der circadianen Rhythmen unterbinden müssen, aber die Rhythmen dürften nicht verschwinden. Freilauf wäre zu beobachten gewesen. Stattdessen wurden die Tiere arrhythmisch, wenn die beiden SCN elektrolytisch zerstört wurden (Moore and Eichler (1972), Stephan and Zucker (1972)). Wird nur ein SCN zerstört oder ist nur ein Teil betroffen, bleibt der Rhythmus erhalten (Schwartz and Zimmerman (1991)).

Ein weiterer wichtiger Hinweis auf die Hauptoszillator-Rolle des SCN waren Messungen einer rhythmischen elektrischen Aktivität im SCN. Dieser Rhythmus war auch im SCN nachweisbar, wenn es durch Läsionen vom umgebenden Gewebe isoliert wurde. Im umgebenden Gewebe war der Rhythmus jedoch nach der Läsion verschwunden (Abbildung 3.5 und Inouye and Kawamura (1979)). Damit war nachgewiesen, daß der SCN ein autonomer Rhythmus-Generator ist und den Rhythmus

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Folgende Befunde weisen auf ein Multioszillatorsystem hin (A8 (n.d.)):



Abbildung 3.5: Isolation des SCN vom benachbarten Gewebe durch einen ringförmigen Schnitt unterbindet die tagesrhythmische elektrische Aktivität außerhalb des SCN. Der Tagesrhythmus der elektrischen Aktivität im SCN bleibt aber erhalten. Nach Inouye and Kawamura (1979). D044D/scn-isolation



Abbildung 3.6: Der Stoffwechsel im SCN hat einen circadianen Verlauf, wie durch durch die Anhäufung des Glukose-Analogons 2-deoxi-D-glukose gezeigt werden kann (dieses Analogon wird im Gegensatz zu Glukose nicht im Stoffwechsel abgebaut). Während der Tagphase ist die Konzentration im SCN hoch, während der Nachtphase niedrig. Jeder Punkt ist das Ergebnis einer Bestimmung an einem Tier, welches zu dieser Zeit getötet wurde. Die rechte Kurve ist von Tieren mit intakten Augen im LD Zyklus, die linke Kurve von geblendeten Tieren (also im physiologischen DD). Nach Schwartz et al. (1979). D044E/scn-rhythmus



Abbildung 3.7: Elektrische Aktivität in SCN Neuronen (Feuer-Rate (Hz)) in vitro während drei circadianer Zyklen (circadiane Zeit, x-Achse). Mittelwerte von 4 (erster Zyklus, 8 (zweiter Zyklus) und 3 Messungen. Grau: Subjektive Nacht. Nach Prosser and Gillette (1989). D044F/scn-isolation
an andere Strukturen über Nervenverbindungen weiterleitet. Neuere Untersuchungen zeigten, daß auch Substanzen eine Rolle zu spielen scheinen, die vom SCN diffundieren und rhythmisches Verhalten steuern (Silver et al. (1996)). Der Stoffwechsel im SCN verläuft ebenfalls tagesrhythmisch (Schwartz and Gainer (1977)). Am Tage ist er hoch, nachts niedrig (Abbildung 3.6). Dieser Rhythmus läuft auch in vitro ab (Newman and Hospod (1986)). Dazu wurden 500  $\mu m$  dicke hypothalamische Schnittpräparate verwendet (Green and Gilette (1982), Groos and Hendricks (1982), Shibata et al. (1982)). Das Feuern einzelner Neurone kann bei geeignetem Medium und richtiger Temperatur bis zu drei Tagen unter konstanten Bedingungen verfolgt werden (Prosser and Gillette (1989), Abbildung 3.7). Durch cAMP kann die Phase des elektrischen Aktivitätsrhythmus verschoben werden. Fötale SCN zeigen bereits circadiane Rhythmen der Stoffwechselaktivität (Reppert and Schwartz (1983)). Sie werden durch den Rhythmus der Mutter über verschiedene Signale, unter anderem Dopamin und Melatonin, synchronisiert (Review: Reppert (1995)).

Goldhamster, deren SCN entfernt wurde, und die dadurch arhythmisch wurden, zeigen wieder einen circadianen Rhythmus ihres Verhaltens, wenn ihnen fötales SCN-Gewebe implantiert wird (Lehman et al. (1987), siehe Abbildung 3.8 für Ratten). Dieses Gewebe kann auch von anderen Arten stammen (Goldhamster, Mäuse oder Ratten). Die induzierte Periodenlänge entspricht der des Donors (Goldhamster, Mäuse). Fötales SCN-Gewebe von Ratten dagegen induziert einen Rhythmus mit einer Periode, die kürzer als die des Rezeptors und des Donors ist (Sollars et al. (1995)).

Auch Kulturen von SCN-Zellen können noch nach Wochen einen circadianen Rhythmus in Goldhamstern induzieren, bei denen beide SCN zerstört worden waren. Sie wurden dazu ins Gehirn an die Stelle implantiert, an der sich das SCN normalerweise befindet (Silver et al. (1990)). Die Struktur des SCN muß also nicht erhalten sein. Werden die SCN-Zellen zweier Genotypen mit verschiedenen Perioden zusammen implantiert, ergibt sich ein kohärenter Rhythmus. Die Zellen können also miteinander kommunizieren und sich auf eine mittlere Periodenlänge einigen. Transgene Zellen mit Markierungen können benutzt werden, um die verantwortlichen Zellen zu kennzeichnen (Ralph et al. (1993)).

Interessant sind auch Untersuchungen von Welsh et al. (1995). An individuellen, voneinander dissoziierten SCN-Neuronen wurden mit Multimikroelektrodenplatten elektrische Aktivitäten für längere Zeit gemessen. Innerhalb einer Kultur gab es Zellen mit unterschiedlichen Phasen und Perioden, obwohl funktionelle Synapsen vorhanden waren (Welsh et al. (1995)).

Was sind die Schrittmacherzellen im SCN? Gibt es verschiedene funktionelle Teile des SCN? Das SCN der Säuger besteht aus 8000 bis 10 000 Neuronen. In einem vertikalen Schnitt gesehen bilden sie einen Kern und eine Schale mit charakteristischen Neurotransmittern ihrer Neurone, mit unterschiedlicher Innervation (Übersicht Moore (1997), Esseveldt et al. (2000), Abbildung 3.9) und wahrscheinlich auch mit unterschiedlicher Funktion: Die Oszillatoren in den Kernzellen scheinen auf Lichtbedingte Signale der Retina zu reagieren, während die Oszillatorzellen der Schale das nicht tun. Die Kern-und Schale-Oszillatoren sind aber miteinander gekoppelt und haben dadurch die gleiche Phasenbeziehung<sup>2</sup>. Die elektrophysiologische Aktivität horizontal geschnittener Scheiben eines Hamster-SCN zeigt zwei spe-

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Die 'Totzone' der Phasenresponskurve eines Nagers auf Lichtpulse könnte so erklärt werden, dass hier die Zahl der Oszillatoren, die nicht auf Licht reagieren, grösser ist als die der Licht-empfindlichen (Shigeyoshi et al. (1997)).



Abbildung 3.8: Einer Ratte wurde am 28. Tag des Freilaufs (Laufradaktivität) das SCN entfernt (scnx). Es wurde arrhythmisch, wie im linken Aktogramm gezeigt. Wenn fötales SCN-Gewebe implantiert wird (85. Tag, *trans*), zeigt sich wieder ein circadianer Rhythmus der lokomotorischen Aktivität. Rechts sind die Leistungsspektren für die prä-Läsionszeit (oben), die post-Läsionszeit (center) und die post-Transplantationsperiode (unten) gezeigt. Der 25 Stunden Rhythmus, der vor der Läsion signifikant ist (grünes Maximum über der Signifikanzlinie), verschwindet (blaue Kurve) und erscheint wieder, nachdem neonatales SCN implantiert wurde (rote Kurve). Nach Wollnik (1995). D044FA/scn-implantat

zifische oszillierende Komponenten (Jagota et al. (2000)). Sie könnten die Aktivität eines *Morgen- und eines Abend-Oszillators* wiederspiegeln, was bereits früher aus Verhaltensstudien geschlossen wurde (Pittendrigh and Daan (1976), Illnerova and Vanecek (1982)). Photoperiodische Reaktionen sollen durch das Zusammenwirken eines Morgen- und Abend-Oszillators zustande kommen. Tatsächlich beeinflussen lange und kurze Photoperioden die Maxima der Morgen- und Abend-Komponente der elektrischen Ableitungen unterschiedlich (Jagota et al. (2000)).

Retinale Information wird über den retinohypothalamischen Trakt (RHT, Abbildung 3.14) und zusätzlich auf dem Weg über das intergenikulate Blatt (IGL) über den genikulohypothalamischen Trakt (GHT) zum ventrolateralen Teil (shell) des SCN geleitet. Dieser enthält Neuronen, deren Feuern unter circadianer Kontrolle steht. Die Rhythmen sind Lichtabhängig. Der dorsomediale Teil (core) bekommt Eingänge aus nicht-visuellen Quellen und die Neuronen zeigen deshalb Rhythmen, die Licht-unabhängig sind (Ibata et al. (1999)). Die Feuer-Rate der Neuronen zeigt einen circadianen Rhythmus. Hohe Feuer-Raten während des subjektiven Tages scheinen mit Peptiden und dem Neurotransmitter gamma-amino-Buttersäure (GABA) zu korrelieren und normale synaptische Interaktionen zu benutzen. Rhythmische Informationen könnten aber auch über diffundierende Substanzen übertragen werden.

Nach Zerstörung des SCN bleiben andere Rhythmen noch erhalten, wie das antizipatorische Nahrungsaufnahme-Verhalten: Mäuse, denen die SCNs entfernt wurden, zeigen weiterhin dieses Verhalten. Sie werden also durch ein weiteres Schrittmacherzentrum gesteuert. Zellpopulationen in verschiedenen Gebieten des Hypothalamus scheinen dafür verantwortlich zu sein (Marchant and Mistlberger (1997)).



Abbildung 3.9: Oben: Die suprachiasmatischen Kerne (SCN) der Säuger sind paarige Strukturen an der unteren Spitze des dritten Ventrikel und über ('supra´) dem optischen Chiasma im Hypothalamus. Ein Coronalschnitt durch das SCN zeigt einen dorsomedialen Teil ('shell') und einen ventrolateralen Teil ('core'). Eingänge kommen von der Retina über den retinohypothalamischen Trakt (RHT), den Raphekern und das intergeniculate Blatt (IGL). Ausgänge ziehen zum Thalamus, den paraventrikulären Kern (PVN) und andere Gebiete des Gehirns. Die Schale (shell) soll aus zahlreichen zellulären Oszillatoren bestehen, die nicht auf Lichteingänge reagieren. Der Kern (core) soll dagegen aus zellulären Oszillatoren bestehen, die auf Lichtsignale reagieren. Unten: Ein Horizontalschnitt zeigt das vordere SCN (rot), welches aus einer Population von Zellen besteht, die Morgen-Oszillatoren darstellen, und aus dem hinteren SCN (grün), die Abendoszillators repräsentieren. Kopplung zwischen den verschiedenen Gruppen ist durch die Doppelpfeile angedeutet. Nach Shigeyoshi et al. (1997), Inouye et al. (1993) und Dunlap (2000). E044F3/scnstructure

Ob auch der circadiane Rhythmus des REM Schlafes vom SCN gesteuert wird, ist umstritten (Stephan and Nunez (1977), Mouret et al. (1978), Yamaoka (1978)). Es wurde bereits erwähnt, daß sich in der Retina ein circadianer Oszillator befindet. Möglicherweise gibt es auch einen enterischen Oszillator. Ob alle diese Oszillatoren den gleichen Uhr-Mechanismus benutzen, muß geklärt werden. Übersichtartikel siehe Rosenwasser and Adler (1986).

Die Kontrolle der Körpertemperatur findet hauptsächlich im präoptischen Gebiet (POG) und im vorderen Hypothalamus (POAH) statt (Berner et al. (1999), Hori et al. (1999)). Das POAH ist Temperatur-empfindlich und ein Integrationszentrum (Saarela and Reiter (1994)). Läsionen in diesem Gebiet stören die Temperatur-Regulation (A9 (n.d.)). Auch die Temperatur der Umwelt beeinflußt die Kontrolle der Körpertemperatur. Außerdem wirkt das Verhalten auf die Temperatur-Regulation. Bilaterale POAHX bei Ratten verschiebt den Durchschnittswert der Temperatur von 37.0 auf 38.6<sup>0</sup>C. Der circadiane Rhythmus der Körpertemperatur bleibt aber erhalten, die Amplitude des Rhythmus wird sogar dreifach höher. Durch die Operation ist also die Temperatur-Regulation beeinflußt, aber nicht der circadiane Rhythmus der Temperatur-Regulation.

Die circadiane Kontrolle der Temperatur-Regulation erfolgt im SCN des Hypothalamus. Dafür gibt es inzwischen eine Reihe von sicheren Hinweisen, auf die später noch eingegangen wird. So verschwindet der circadiane Rhythmus der Körpertemperatur (und der Aktivität), wenn die suprachiasmatischen Kerne zerstört werden (Moore and Eichler (1972), Stephan and Zucker (1972), Abbildung 3.10). Die mittlere Temperatur bleibt aber erhalten, die homöostatische Regulation der Körpertemperatur ist noch intakt.

Ausgewählte Stämme, die sich in verschiedenen circadianen Parametern unterscheiden, die mit dem Nestbau zu tun haben, besitzen unterschiedliche Mengen von AVP-immunoreaktiven Neuronen im SCN (Bult et al. (1993)). Im Licht-Dunkel-Zyklus schwankt die Zahl und das Volumen der Vasopressin-enthaltenden Zellen mit einer circadianen und annualen Periode (Hofman and Swaab (1993)).

Wie die Oszillatoren im SCN die lokomotorische Aktivität und andere Ereignisse circadian kontrollieren, ist bisher wenig bekannt (siehe Abschnitt 3.4). Abbildung 3.12 zeigt, wie eine Zielzelle vom SCN sowohl über cytoplasmatische als auch über im Kern ablaufende Reaktionen die neuronalen Signale der circadianen Kontrolle erhält. Sowohl Neuropeptid Y als auch Serotonin sollen bei der Signalübertragung durch afferente Neuronen des SCN beteiligt sein (Marchant and Mistlberger (1997)). Wird Neuropeptid Y systemisch angeboten, wird der circadiane Rhythmus der lokomotorischen Aktivität von Mäusen beeinflußt (Lach and X (1995)). Die Abbildung zeigt auch die Weiterleitung der Lichtsignale von den retinularen Ganglienzellen im Auge über den retinohypothalamischen Trakt. Details in der Legende.

Was sind die Zielorgane der efferenten Signale des SCN? Von den Ausgängen des SCN sind bisher nur die Projektionen zum Pinealorgan völlig bekannt. Wie anderes Effektorgewebe die Informationen vom SCN erhält, ist nur unvollständig bekannt. Wird die Information nur über Neurone übertragen? Ist die Information nur als Puls kodiert?

Bei Vögeln wird das SCN der Säuger durch das visuelle SCN (vSCN) repräsentiert. Nach einem Ring-Modell fungieren Pinealorgan und vSCN bei Vögeln als gedämpfte Oscillatoren mit einer gegenseitigen Phasenbeziehung von 180°: Das Pinealorgan ist während der Nacht aktiv, das vSCN während des Tages. Das Auge hat einen Rhythmus, der durch das visuelle System getrieben wird, oder es fungiert als weiterer Os-



Abbildung 3.10: Der circadiane Rhythmus der *Körpertemperatur* (und der Aktivität) eines syrischen Hamsters verschwindet, wenn die suprachiasmatischen Kerne zerstört werden (am elften Tag). Periodogramme für Tag 2 bis 11 oben rechts, für Tag 24 bis 33 darunter. Nach Refinetti et al. (1994). D044GT/ktrhythmus



Abbildung 3.11: Der circadiane Rhythmus der *lokomotorischen Aktivität* eines syrischen Hamsters verschwindet, wenn die suprachiasmatischen Kerne zerstört werden (am elften Tag). Periodogramme für Tag 2 bis 11 oben rechts, für Tag 24 bis 33 darunter. Nach Refinetti et al. (1994). D044GA/ktrhythmus



Abbildung 3.12: Molekulare Ereignisse zwischen Lichtaufnahme, SCN Uhren-Neuronen und Zielzellen. Licht wird in einer retinularen Ganglienzelle aufgenommen. Glutamat (violette Kreise) wird als Neurotransmitter abgegeben und reagiert mit Rezeptoren (schwarzes Rechteck). Jetzt kommt ein negativer Rückkopplungskreis mit Verstärkungsfaktoren CLOCK (güne Quadrate) und BMAL (blaue Kreise) zum Zuge. Die Expression von mPer und mCry der Uhr-Gene (cg) wird in Gang gesetzt über einen Weg, an dem auch Ca<sup>2+</sup> beteiligt ist. Uhr-Protein-mRNA (rote Kreise mit ~) wird produziert und verläßt den Kern. Uhr-Protein (Dreiecke) wird im Zytoplasma synthestisiert und gelangt in den Kern (mCRY). Es interagiert mit mPER und erleichtert seine Translation, indem es die CLOCK-(grün) und BMAL-(blau) abhängige Transkription blockiert. Als Folge sinkt die mRNA Konzentration. Mit Zeitverzögerung werden negativ wirkende Komplexe inaktiviert und die Genexpression beginnt wieder. Die nächste Runde negative und positiv wirkender Faktoren beginnt die rhythmische Expression der ccg´s anzukurbeln. Das Produkt der ccg´s, Uhr-kontrollierte Proteine, liegen außerhalb des eigentlichen Rückkopplungskreises. Sie geben aber Informationen über die Tageszeit an die SCN-Neuronen und deren Zielzellen über synaptische oder parakrine Signale weiter. Das führt zu Ziel-spezifischen circadianen Ausgängen über cytoplasmische Reaktionen oder Reaktionen im Kern, die sekundäre ccg´s beeinflussen. Ein Beispiel ist die NAcTFase, die die Melatoninsynthese kontrolliert. Nach Hastings and Maywood (2000). E044GC

zillator (Reme et al. (1991)).

# 3.5 Molekulare Mechanismen der circadianen Oszillatoren

Ein molekulares Modell der circadianen Uhr der Säuger ist in Abbildung 3.13 gezeigt. Es besteht aus mehreren Uhr-Genen, die durch Rückkopplung, Zeitverzögerung und Interaktion mit Transkriptionsfaktoren ihre eigene Expression hemmen. Licht synchronisiert den Oszillator, indem es von Photorezeptoren absorbiert wird und ein Signal an die Uhr-Gene sendet.

## 3.6 Pinealorgan und Melatonin

Das Pinealorgan steht mit dem SCN in Verbindung und wird von der Retina über das SCN synchronisiert (Abbildung 3.14). Das Pinealorgan bildet einen neuroendokrinen Rückkopplungskreis (Lu and Cassone (1993)). Bisher glaubte man, daß es beim Säuger -im Gegensatz zu Vögeln und Reptilien- ohne Einfluß auf den circadianen Rhythmus ist. Melatonin wirkt aber auch auf das SCN zurück und moduliert Aktivitätsmuster und andere Prozesse. Die Art und Wirkungsweise dieser Rückkopplung ist unbekannt. Obwohl Pinealektomie bei Ratten den circadianen Rhythmus im Licht-Dunkel-Wechsel und im Dauerdunkel nicht beeinflußt, wird im Dauerlicht die Laufradaktivität stark gestört. Entweder reguliert die Rückkopplung vom Pinealorgan zum SCN die Lichtempfindlichkeit des SCN oder den circadianen Ausgang vom SCN (Cassone et al. (1993)).

Bereits in den dreissiger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts war bekannt, daß die Reproduktion verschiedener Nager durch die Tageslänge kontrolliert wird (Baker and Ranson (1932), Bissonette (1932)). Die Bedeutung des Pinealorgans für diese photoperiodische Steuerung wurde erst allmählich geklärt. Zunächst glaubte man, daß Melatonin vom Pinealorgan sekretiert wird, um den hemmenden Effekt des Kurztages auf das Gonadensystem zu übertragen. Das Pinealorgan wurde als eine antigonadotrope Drüse angesehen. Viele Untersuchungen sprachen auch dafür. Erst später fand man, dass das Pinealorgan auch eine progonadotrope Wirkung hat (Herbert (1972) am Frettchen, Hoffmann (1972) am Djungarischen Hamster). Neben dem reproduktiven System werden beim Djungarischen Hamster auch Körpergewicht, Fellfarbe (Hoffmann (1973), Figala et al. (1973)) und die Körpertemperatur-Regelung photoperiodisch geregelt (Steinlechner and Heldmaier (1989)). Somit übermitteln das Pinealorgan und sein Hormon Melatonin die photoperiodischen Signale der Umwelt auf die neuroendokrine Achse. Diese Signale können stimulierend oder hemmend sein (Hoffmann (1981b)).

Melatonin wirkt nicht nur auf Gonaden und andere physiologische Vorgänge, sondern auch auf den SCN. Hier hemmt es die neuronale Aktivität und verschiebt die Phase des circadianen Rhythmus (Abbildung 3.15).<sup>3</sup>

Melatonin spielt auch eine immunoregulatorische Rolle (Conti and X (1996)). Weiteres über Melatonin ist unter Spezialthemen im Abschnitt 20.8 zu finden. Über die physiologischen Wirkungen der Photoperiode auf die Fortpflanzung von Säugern siehe den Abschnitt 13.4. Einen Übersichtsartikel über Melatonin und seine Wirkung als photoperiodisches Signal gibt Steinlechner (1992) und wird in einer speziellen Ausgabe des Journal

 $<sup>^{3}\</sup>mathrm{Ein}$  Melatonin-Agonist verschiebt den circadianen Rhythmus von Mäusen (und Goldhamstern) phasenabhängig (Van Reeht and X (1997))



Abbildung 3.13: Molekulares Modell der circadianen Uhr von Säugern: Uhr-Gene mper1, mper2 und weitere (nicht gezeigt) hemmen mit Zeit-Verzögerung durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren BMAL und CLK ihre eigene Expression. PER wird durch Phosphorylierung (P) abgebaut. Licht synchronisiert den Oszillator, indem es von Photorezeptoren absorbiert wird und ein Signal an die Uhr-Gene sendet. Nach King and Takahashi (2000), Dunlap (1998) und Reppert and Weaver (2000). E044GB/molmodmam



Abbildung 3.14: Neuronale Organisation des circadianen Systems der Säuger. Der suprachiasmatische Kern SCN besteht aus zahlreichen zellulären Oscillatoren, die in spezifischer Weise miteinander organisiert und gekoppelt sind. Licht synchronisiert das SCN direkt durch Signale über den RHT (Neurotransmitter sind Glutamate GLU und Substanz P SP) und indirekt über das intergenikulate Blatt IG und den geniculohypothalamischen Trakt GHT (Neurotransmitter sind Neuropeptid Y NPY und gammaamino-Buttersäure GABA). Es gibt außerdem einen serotonergen Eingang in das SCN vom Raphekern (Serotonin als Neurotransmitter). Circadiane Signale beeinflussen die Melatoninsekretion des Pinealorgans über eine multisynaptische Verbindung. Sie schließt das obere Cervicalganglion, den paraventrikulären Kern, die prä- und post-ganglionären Fasern des peripheren sympathischen Nervensystems ein (nicht gezeigt). Melatonin wird in das Blutsystem abgegeben. Es wirkt außerdem auf das SCN zurück (rote Pfeile). Das SCN kontrolliert ferner eine große Zahl physiologischer Vorgänge und Verhaltensweisen, unter ihnen die hypothalamische Temperatur und die lokomotorische Aktivität. Letztere wirkt auf das SCN zurück (roter Pfeil). Nach Wollnik (1995). E044Hn/pineal



Abbildung 3.15: Je nach Phasenlage verschiebt ein Melatoninpuls den circadianen Rhythmus beim Menschen. Nach Lewy et al. (1992). D044/cr-melatonin

of Biological Rhythms diskutiert (Czeisler and Turek (1997)).

Im Gegensatz zu anderen Vertebraten kann das Pinealorgan der Säuger kein Licht wahrnehmen. Nur die Retina ist dazu in der Lage. Das Lichtsignal wird auf einem komplizierten Weg über das SCN zum Pineal geleitet (Abbildung fehlt xxx??).

# 3.7 Rückkopplungen und Maskierung

Die lokomotorische Aktivität wird nicht nur circadian kontrolliert, sondern wirkt auch auf die circadianen Oscillatoren im SCN zurück. So ist bei einer hyperaktiven Mutante (Wocko-Maus) die Periode verkürzt (Sollars et al. (1995)). Zu den circadianen Schrittmachern im SCN führen serotonerge afferente Nerven vom Raphekern des Mittelhirns. Werden diese selektiv ausgeschaltet (durch Mikroinjektion von Serotoninhemmstoffen), ohne den Noradrenalingehalt und die Neuropeptid Y - Immunoreaktivität zu beeinflussen, wird die Stärke der Laufradaktivität nicht beeinflußt. Die Tiere lassen sich aber nicht mehr durch tägliche zweistündige Laufradaktivität synchronisieren. Serotonerge Afferenzen sind demnach für diese Art der Synchronisation nötig (Edgar et al. (1997), siehe Abbildung 3.14).

Die Periodenlänge kann beeinflußt werden, wenn der Zugang zum Laufrad auf bestimmte Zeiten des Zyklus beschränkt wird. Sie ist kürzer, wenn die Mäuse zu Beginn der subjektiven Nacht laufen können (also zu Beginn ihrer Aktivitätsperiode) und länger, wenn sie am Ende der subjektiven Nacht Zugang zum Laufrad haben (also am Ende ihrer Aktivitätsperiode) (Edgar et al. (1991b)). Die Uhr kann also auch durch physiologische und/oder Verhaltens-bedingte Faktoren beeinflußt werden.

Wird die Stärke der lokomotorischen Aktivität von Mäusen beeinflußt, kann der Schlaf-Wach-Zyklus und der Aktivitätsrhythmus modifiziert werden. Es handelt sich dabei aber nicht um eine grundlegende Änderung des Uhr-Mechanismus und seiner Kopplung, sondern um 'Maskierung' (Mrosowsky (1994), Edgar et al. (1991a)).

# 3.8 Mutanten des circadianen Systems bei Nagern

Beim Goldhamster wurde durch Zufall eine Mutante entdeckt, deren lokomotorischer Aktivitätsrhythmus statt einer Periode von 24 Stunden eine solche von 22 Stunden im heterozygoten und von 20 Stunden im homozygoten Zustand hat. Sie wurde *tau* genannt (Abbildung 3.16). Das verantwortliche Gen ist autosomal. Die Mutation ist semi-dominant (Ralph and Menaker (1988)). Leider ist die Genetik des Goldhamsters schlecht untersucht. Wird das



Abbildung 3.16: *tau*-Mutante des Goldhamsters. Der lokomotorische Aktivitätsrhythmus hat bei der homozygoten Mutante eine Periodenlänge von 20 Stunden (im heterozygoten Zustand 22 Stunden, nicht gezeigt), während die Periodenlänge des Wildtyps 24 Stunden beträgt. Nach Ralph and Menaker (1988). D044I/tau-mutante

SCN eines Fötus in einen arhythmisch gemachten Hamster (SCN wurde zerstört) implantiert, wird dieser Hamster wieder rhythmisch (siehe vorigen Abschnitt). Nimmt man das SCN vom Fötus einer *tau* Mutante, zeigt der Wirt die kurze Periode von *tau* (Ralph and et al (1990)). Das zeigt besonders überzeugend, daß der SCN ein Oszillatorsystem ist und sich die Rhythmus-Eigenschaften durch Transplantation übertragen lassen .

Wird das SCN nur teilweise zerstört und ein SCN implantiert, entsteht ein chimäres Tier mit zwei Rhythmen, von denen einer vom Donor und einer vom Wirt stammt. Die circadianen Rhythmen beeinflussen sich nicht gegenseitig.

Es ist bekannt, daß auch in der Retina von Säugern sich eine circadiane Uhr befindet. Beim Hamster wurde gezeigt, daß diese bei der *tau*-Mutante ebenfalls eine kurze Periode hat. Bei der *tau*-Mutante ist also nicht der SCN betroffen, sondern die circadiane Uhr.

Die Phasenresponsekurven der *tau*-Tiere sind wie die des Wildtyps, wenn man die Perioden normalisiert. Das bedeutet, die Bewegung des Oszillators ist bei *tau* gleichmäßig beschleunigt und nicht nur in einem Teil des Zyklus.

Der Östrus-Zyklus des Goldhamsters ist 4 mal länger als der circadiane Rhythmus. Das gilt auch, wenn die Tiere im Dauerlicht eine andere Periode haben oder durch  $D_2O$  ihr circadianer Rhythmus verlangsamt wird. Bei der *tau* Mutante ist der Östrus-Zyklus 5 mal länger als der circadiane Rhythmus der Mutante (5\*20=100 h). Das entspricht aber auch etwa der Dauer des Wildtyps (24\*4=96 h).

Es ist nicht bekannt, ob der Freßrhythmus, das 'disk shedding' in der Retina und die photoperiodischen Reaktionen der *tau* Mutante geändert sind.

Die Genetik der **Maus** ist sehr viel besser untersucht als die des Goldhamsters. Es war deshalb ein Glücksfall, als auch bei ihr eine Mutante gefunden wurde, deren Periode geändert ist. Sie wurde durch Behandeln von Männchen mit ENU erhalten. Die Behandlung macht die Tiere zunächst steril, aber nach 12 bis 16 Wochen werden sie wieder fertil. Sie wurden mit Weibchen gekreuzt und die erste Generation auf Mutanten durchmustert. Es wurde erwartet, daß unter 1500 Tieren eins für einen bestimmten Locus mutiert ist. Tatsächlich fand sich eine solche Mutante (Abbildung 3.17, Vitaterna et al. (1994)). Die Periodenlänge dieser 'clock' ('circadian locomotor output cycles kaput') ist im Dauerdunkel und im heterozygoten Zustand um eine, im homozygoten Zustand um 4 bis 5 Stunden verlängert. Nach 5 bis 15 Zyklen werden die Tiere arrhythmisch. Sie weisen dann einen ultradianen Rhythmus von 6 bis 9 Stunden auf. Die Entwicklung ist normal, die Aktivität während des Tages relativ hoch. CLOCK ist ein essentielles Gen für das circadiane System (King et al. (1997), Antoch et al. (1997)). Es liegt in der Mitte des fünften Chromosoms. Die Mutante hat keine Defekte im SCN.

Das Clock-Gen wurde kloniert (cloning by rescue, King et al. (1997)). Es hat eine große Transkriptionseinheit mit etwa 100 000 Basenpaaren und 24 Exons. Es kodiert für ein neues basisches-Helix-Loop-Helix-PAS Domain Protein. Überexpression des Clock Transgens verkürzt die Periodenlänge (Antoch et al. (1997)). CLOCK ist damit ein weiteres Beispiel für ein Uhr-Protein mit PAS-Domäne (neben PERI-OD von *Drosophila*). Dieses Motiv könnte eine in der Evolution konservierte Eigenschaft des circadianen Uhr-Mechanismus bestimmen (King et al. (1997)).

Eine weitere Mutante, *Whl*, wurde gefunden. Die Mutation liegt auf dem vierten Chromosom. Ihre Periodenlänge war länger als die der Ausgangsform (24.20 gegenüber 23.32 Stunden) (*Pickard and X (1995)*). Sie hat weitere abnorme Eigenschaften wie Hyperaktivität, kreisende Bewegungen und eine geänderte Reaktion auf Licht.

Bei einer Maus, der ein neuronales Adhäsionsmolekül mit Polysialsäure fehlt, ist der circadiane Rhythmus verändert (Shen and x (1997)).

Nicht nur Mutanten, sondern auch Stämme können sich in ihren circadianen Periodenlängen unterscheiden (Hofstetter and X (1995)). Im Dauerdunkel waren die Periodenlängen für Stamm B6 23.8 h, für D2 23.7 Stunden und für C 23.6. Im Dauerlicht waren die Perioden 25.1 Stunden für B6, 23.9 Stunden für D2, und 25.5 Stunden für C. Es wird vermutet, daß es sich um eine polygene Vererbung handelt (Mayeda et al. (1996)). Die beiden Stämme BALB/cByJ and C57BL/6J unterscheiden sich in ihrer Freilauf-Periode um 50 Minuten voneinander (Schwartz and Zimmerman (1990)).

Der circadiane Rhythmus der Aktivität von BALB/c Mäusen ist sehr labil. Freilaufperiode und Kohärenz des Laufrad-Rhythmus änderten sich spontan. Das circadiane System dieses Stammes besteht demnach aus einer Population schwach gekoppelter Oszillatoren (Rosenwasser (1990)).

Es ist zu erwarten, daß in der nächsten Zeit sich einiges tut, wenn molekularbiologische Verfahren angewendet werden. Ein Zitat von Menaker and Takahashi (1995): "Reverse genetics" (from gene to phenotype) with targeted gene transfer provides a powerful tool to dissect behavior and has been used successfully to study the effects of null mutations in genes implicated in the regulation of long-term potentiation and spatial learning in mice. In addition, "forward genetics" (from phenotype to gene) with high-efficiency mutagenesis in the mouse can uncover unknown genes and has been used to isolate a behavioral mutant of the circadian system. With the recent availability of high-density genetic maps and physical mapping resources, positional cloning of virtually any mutation is



Abbildung 3.17: Die Periodenlänge von '*clock*' ('circadian locomotor output cycles kaput') ist im Dauerdunkel und im heterozygoten Zustand um eine, im homozygoten Zustand um 4 bis 5 Stunden verlängert (mittlere Abbildung; Kontrolle links). Nach 5 bis 15 Zyklen werden die Tiere arrhythmisch. Sie weisen dann einen ultradianen Rhythmus von 6 bis 9 Stunden auf. Werden heterozygote Tiere miteinander gekreuzt, ergeben sich in der F2 Generation zwei verschiedene Gruppen mit einer mittleren Periode um 23.5 und 24.6 Stunden (rechte Histogrammdarstellung). Nach Vitaterna et al. (1994). D044J/clock-mutant

now feasible in the mouse. Together, these approaches permit a molecular analysis of both known and previously unknown genes regulating behavior.

# 3.9 Andere circadiane Rhythmen

Neben der lokomotorischen Aktivität und der Körpertemperatur wurden auch andere Rhythmen bei Nagern untersuche. Der Schlaf-Wach-Rhythmus kann über die lokomotorische Aktivität bestimmt werden. Genauer ist ein EEG. Nur mit ihm ist es möglich, einwandfrei zu bestimmen, ob ein Tier schläft. Ausserdem können mit einem EEG die verschiedenen Schlafstadien bestimmt werden. Eine automatische Registriereinheit und Auswertemethoden wurden dazu entwickelt (Van Gelder and X (1991)). 'Disk shedding´ steht auch unter circadianer Kontrolle. Die Stäbchen (Nachtsehen) und Zäpfchen (Tagsehen) des Vertebratenauges werden nicht, wie andere Zellen des Körpers, im Laufe der Zeit erneuert. Stattdessen werden die Geldrollen-artig angeordneten Scheiben ('Disks') im äußeren Segment an der Spitze abgestoßen und basal erneuert. Diese 'innere Erneuerung' geschieht zu Zeiten, in denen die Photorezeptoren nicht gebraucht werden. Stäbchen werden also am Morgen, Zäpfchen am Abend regeneriert.

Männliche Hausmäuse entwickeln 18 bis 20 Tage nach dem Coitus (Ejakulation) Vater-Verhalten gegenüber den eigenen Nachkommen. 50 bis 60 Tage später verschwindet es wieder und stattdessen werden Junge getötet. Dieses Verhalten ist mit dem Fortpflanzungszyklus der Weibchen synchronisiert. Es funktioniert aber auch ohne soziale Schlüssel und ohne Änderungen der Hypophysen- und Gonaden-Hormone. Werden die Tiere entweder in einem 22-Stunden-Tag (11 Stunden Licht, 11 Stunden Dunkelheit) oder in einem 27 -Stunden-Tag (13.5 Stunden Licht, 12.5 Stunden Dunkelheit) gehalten, tritt das Verhalten nach der gleichen Zahl von Zyklen auf, aber nicht nach der gleichen Zahl von Tagen; es ist also circadian gesteuert. Die physiologischen Grundlagen dieses Verhaltens sind unbekannt (Perrigo et al. (1992)).

# 3.10 Photoperiodismus bei Mäusen?

Während viele Nager sich jahresperiodisch fortpflanzen und sich dabei nach der Tageslänge richten (*Peromyscus maniculatus* als Beispiel *Nelson and X (1997)*), obwohl auch hier in einer Population nicht alle Tiere photoperiodisch reagieren (Blank (1992), Ruf and X (1997))<sup>4</sup>, scheint es bei der Maus keine photoperiodische Reaktion der Fortpflanzung zu geben. Sie können aber durchaus photoperiodische Informationen verarbeiten (zum Beispiel zum Kontrollieren der Felldichte). Nur sind diese nicht mit der Reproduktion gekoppelt, obwohl nach neueren Beobachtungen Ovargröße und Uterusmasse der Weibchen von Mäusen auf die Tageslänge reagieren (Nelson (1990)).

Die tropische Maus Zygodontomys brevicauda zeigt kein photoperiodisches Verhalten (Heideman and X (1990)).

#### 3.11 Mus booduga

Dun-Die indische Feldmaus Mus booduga wurde in Madurai und in Bangalore von Chandrashekaran und Mitarbeitern untersucht (Sharma et al. (1997)). Die lokomotorische Aktivität wird circadian gesteuert. Licht synchronisiert diesen Rhythmus. Bietet man einzelne Lichtpulse zu verschiedenen Phasen im Dauerdunkel an, erhält man eine Phasenresponsekurve mit verzögerten und verfrühten Rhythmen je nach dem Zeitpunkt der Lichtgabe (Sharma (1996)). Nahes UV verschiebt ebenfalls die Phase (Sharma et al. (2000)).

> Obwohl die Dämmerung auf dem Breitengrad von Madurai nur 15 bis 20 Minuten beträgt, synchronisiert natürliche Dämmerung stärker als ein abrupter Licht-Dunkel-Wechsel (Sharma et al. (1997)).

> Die Präzision der Uhr hängt von der Periodenlänge des Rhythmus ab. Wird der Aktivitätsbeginn als Referenz benutzt, ist die Uhr bei einer Periode von 23.8 Stunden am genauesten. Bei längeren und kürzeren Perioden nimmt die Genauigkeit ab (Sharma and Chandrashekaran (1999)).

> Melatonin verschiebt die Phase des Rhythmus. Es beschleunigt die Anpassung des Rhythmus an verfrühende Licht-Dunkel-Zyklen (was einem Flug nach Osten entsprechen würde), verzögert aber die Anpassung an verzögernde Licht-Dunkel-Zyklen (Flug nach Westen) (Sharma et al. (1999)).

#### 3.12 Offene Fragen

Mecker-Kasten: Dieser Abschnitt muss ausgearbeitet werden

• Was ist die molekulare Natur der Gene und Genprodukte?

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Tiere einer Population von *Peromyscus maniculatus* unterscheiden sich in ihrer Reaktion auf Kurztag: Einige bilden die Gonaden völlig zurück, andere teilweise, und wieder andere nicht. Man vermutete, daß es sich dabei um Tiere handelt, deren zeitliches Muster oder Amplitude des Melatonin-Rhythmus sich unterscheidet. Es handelt sich jedoch bei diesen Unterschieden um verschiedene Energiebedürfnisse. Die unterschiedliche Reaktion auf die photoperiodische Behandlung beruht demnach nicht auf Vorgängen im Pineal, sondern auf Folgevorgängen. Die Umgebungstemperatur hat darauf keine Wirkung (Ruf and X (1997)).

- Sind *tau* und *clock* Allele homologer Gene?
- Welche anderen Gene interagieren mit *tau* und *clock*?
- Sind sie Komponenten des circadianen Systems der Säuger?
- Wie viele Gene bestimmen die Uhr, wie interagieren sie?
- Finden diese Interaktionen auf dem Zellniveau oder auf dem System-Niveau statt?
- Ist die circadiane Uhr völlig durch Gene bestimmt? Wie werden die Ausgänge des circadianen Oszillators geregelt, wie die Physiologie und das Verhalten beeinflußt?
- Gibt es Modifizierer von *clock*?

# Kapitel 4

# Gonyaulax: Circadiane Rhythmen

Bei der einzelligen Alge Gonyaulax wurden einige circadiane Rhythmen untersucht wie zum Beispiel die Biolumineszenz, die Aggregation von Zellen, Zellteilung, und Photosynthese. Eine Reihe von Enzymen steht unter der Kontrolle der circadianen Uhr. Licht synchronisiert diese Rhythmen. Bestimmte Substanzen beeinflussen sie.

Andere Dinoflagellaten wie Pyrocystis noctiluca und Pyrocystis lunula zeigen ebenfalls circadiane Rhythmen. Zum Beispiel bewegen sich die Chloroplasten circadian und ihre Ultrastruktur ändert sich tagesperiodisch.

Es wird gezeigt, wie die Biolumineszenz registriert wird. Ihre biochemische Kontrolle wird erläutert und welche Bedeutung sie für die Algen hat.

Vielleicht haben Sie schon einmal erlebt, wie tausende von kleinen Leuchtpunkten zu einer Lichtwolke verschmolzen, als Sie nachts ins Wasser des Mittelmeeres, des pazifischen Ozeans oder anderer warmer Meere sprangen. Ursache dieses spektakulären Feuerwerks ist die Biolumineszenz einer Reihe verschiedener Dinoflagellaten. Eine von ihnen ist *Gonyau* $lax^1$ , einem Einzeller des pazifischen Ozeans.

 $^1 {\rm Die}$  Meeresalge Gonyaulax gehört zur Abteilung der Dinophyta, und hier zur Klasse der Dinophyceae

Diese Algen besitzen ein Zelluloseskelett mit einer äquatorialen und einer longitudinalen Rinne (Abbildung 4.1).



Abbildung 4.1: Gonyaulax polyedra Zelle mit Zellulosepanzer, einer Quer- und einer Längs-Rinne, in denen sich je eine Geisel befindet. Ventralansicht. Durchmesser 40  $\mu m$ . Nach Schussing (1954) und einem elektronenmikroskopischen Bild (Hastings (n.d.)). 045/gonyaulax

In jeder Rinne befindet sich eine Geisel. Chromatophoren dienen der Photosynthese. Unter bestimmten Bedingungen treten die Algen in Massen auf und die Population ist dann auch am Tage durch die rote Fluoreszenz des Chlo-

und zur Ordnung der Peridiniales.

rophylls sichtbar ('Rote Tide´) (Abbildung 4.2).



Abbildung 4.2: Luftaufnahme einer 'roten Tide' am Tage: Die Dichte der Dinoflagellaten ist so groß, dass die Population durch die rote Fluoreszenz des Chlorophylls sichtbar ist. Nach Taylor in Hastings (1994). 045A/redtide

Auch unter Laborbedingungen lässt sich diese Biolumineszenz beobachten. Die Kulturen können in Glaskolben<sup>2</sup> angezogen werden (Abbildung 4.3). Im 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel zeigt sich die Biolumineszenz nur nachts<sup>3</sup>. Aber auch unter konstanten Umweltbedingungen leuchten die Kulturen weiterhin rhythmisch. Sie werden also durch eine innere Uhr gesteuert.

Dieser Rhythmus wurde in verschiedenen Laboratorien intensiv untersucht und gehört zu einem der am besten bekannten (Übersichten Sweeney (1984), Hastings (1959), Roenneberg and Rehman (1998)). Die Biolumineszenz kann für längere Zeit automatisch und in vielen Gefäßen gleichzeitig registriert werden.



Abbildung 4.3: Die Biolumineszenz einer Flasche mit *Gonyaulax polyedra* wurde kurz nach Schütteln des Erlenmeyer-Kolbens fotografiert. Nach Taylor in Hastings (1994). 045B/Gonybiolum

Mehr über das Phänomen der Biolumineszenz bei *Gonyaulax*, ihre rhythmische Steuerung, wie man sie beeinflussen kann und welcher Mechanismus zugrunde liegt, im folgenden. Es gibt einen Videofilm über Biolumineszenz und circadiane Rhythmik bei Dinoflagellaten (Behrmann and Hardeland (1999)).

### 4.1 Tagesperiodisches Leuchten

#### 4.1.1 Registrieranlage zum Messen der Biolumineszenz

Im Labor kann die Biolumineszenz folgendermaßen gemessen werden (Abbildung 4.4): Ein Schlitten mit einem Sekundärelektronen-Vervielfacher (Photomultiplier) wird jeweils unter ein Glasgefäß mit 10 ml einer Algenkulturen  $(5 * 10^3 \text{ Zellen/ml})$  gefahren. Während der Messung (17.8 Sekunden/Probe) wird das Umgebungslicht (0.5 bis 14 Lux am günstigsten) abgeblendet. Dann wird die nächste Kultur auf

 $<sup>^21</sup>$ Liter Fernbachkolben mit F/2 Nährlösung mit Erdextrakt ohne Silikat. Licht-Dunkel-Wechsel 12:12 Stunden, Lichtintensität 130 $\mu\rm Einstein/m^2sek$  (1 $\mu\rm Einstein$ entspricht etwa 60 Lux).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>während der Lichtperiode muss das Licht für eine kurze Zeit ausgeschaltet werden, um die Biolumineszenz der Kultur zu beobachten. Oder man verwendet eine automatische Registrierung, wie im nächsten Abschnitt beschrieben



Abbildung 4.4: Registrieren des Biolumineszenzrhythmus von *Gonyaulax* mit dem 'Taylortron': Ein Sekundärelektronen-Vervielfacher auf einem Schlitten wird durch einen Stufenmotor unter den in einer Reihe angeordneten Glasgefäßen mit Algenkuturen entlanggefahren. Nach dem letzten Gefäß wird der Photomultiplier wieder in die Anfangsposition gefahren. Auf diese Weise wird die Biolumineszenz jeder Kultur in bestimmten Zeitabständen für mehrere Tage im Dauerlicht gemessen. Während der Messung wird das Umgebungslicht vom betreffenden Gefäß abgeblendet. Das Analogsignal wird verstärkt, digitalisiert und in einem Computer gespeichert. (Dunlap et al. (1981), Broda et al. (1986)). E046/biolum-reg

ihre Biolumineszenz getestet, bis alle 2 \* 30 Gefäße (einschließlich Lichtstandard) gemessen wurden und (nach 20 Minuten) die Messung wieder am ersten Gefäß beginnt. Das Mess-Signal wird verstärkt und per Computer registriert. Mit einem speziellen Programm kann die Periodenlänge, die Amplitude der Schwingung und Phasenverschiebungen des Rhythmus bestimmt werden. Durch bestimmte Maßnahmen lassen sich Glimm- und Blitzrhythmus unterscheiden und getrennt registrieren (siehe unten). Biolumineszenz wurde auch an einzelnen Zellen gemessen (Krasnow et al. (1981)).

#### 4.1.2 Blitzrhythmus und Glimmrhythmus

Die Biolumineszenz von *Gonyaulax* besteht aus zwei Phänomenen: einer durch mechanische oder chemische Störungen hervorgerufenen Blitzfolge und einem an ungestörten Kulturen zu beobachtenden viel schwächeren Glimmen (Abbildung 4.5). Die Biolumineszenz des Blitzrhythmus ist in der Mitte der Dunkelperiode am stärksten und tritt nur wenige Stunden pro Tag auf. Ein Blitz dauert 100 ms. Dabei werden  $10^7$  bis  $10^{10}$  Lichtquanten pro Zelle abgegeben. Der Glimmrhythmus dagegen hat die stärkste Biolumineszenz gegen Ende der Dunkelperiode. Eigenschaften und Unterschiede zwischen Blitz- und Glimmrhythmus sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Die Periodenlänge beträgt bei 1200 Lux Dauerlicht 24.4 Stunden. Bei 3800 Lux ist die Periode 22.8 Stunden und der Rhythmus dämpft aus. Bei Intensitäten über 10000 Lux gibt es keinen Biolumineszenzrhythmus mehr. Im Dauerdunkel ist die Periode 23.0 bis 24.4 Stunden und der Rhythmus dämpft ebenfalls aus.

Der Biolumineszenzrhythmus ist, wie für circadiane Rhythmen charakteristisch, relativ unabhängig von der Umgebungstemperatur (Abbildung 4.6, Sweeney and Hastings (1960)). Bei höheren Temperaturen geht die Uhr von Gonyaulax etwas langsamer, der  $Q_{10}$  (siehe Glossar) beträgt 0.85 (Hastings and Sweeney (1957)). Die Temperaturkompensation lässt



Abbildung 4.5: Obere Kurve: Glimmrhythmus (y-Achse: Biolumineszenz) einer Kultur von Gonyaulax polyedra im 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel (bis zur Stunde 0) und danach im schwachen Dauerlicht. Untere Kurve: Glimmrhythmus einer Kultur von Gonyaulax polyedra bei einer konstanten Temperatur von 24<sup>o</sup>C im 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel (bis zum fünften Tag) und danach in schwachem Dauerlicht. Nur das Maximum der Lichtintensität des Glimmrhythmus ist für jeden Tag durch ein Dreieck angegeben. Die Periodenlänge des Rhythmus beträgt im Licht-Dunkel-Wechsel 24 Stunden (synchronisiert) und im Dauerlicht 24.75 Stunden (Freilauf). Nach Hastings (1960). D047/biolum-r-gony

Vorgang	Blitzrhythmus	Glimmrhythmus
Induktion	mechanische und chemische Stimulation	spontan
Dauer	100 ms	kontinuierlich
Maximum	Mitte subjektive Nacht	Ende subjektive Nacht
Periode	LL: 22. 8h, DD: 23-24. 4h	22. 5
Synchron.	6:6 bis 16:16	6:6 bis 16:16
Phasenresponsekurve	ja	ja
Temp. komp.	$Q_{10} = 0.85$	$Q_{10} = 0.85$

Tabelle 4.1: Unterschiede zwischen Blitz- und Glimmrhythmus von Gonyaulax polyedra



Abbildung 4.6: Die Periodenlänge des Blitzrhythmus von Gonyaulax polyedra ist wenig von der Temperatur des Seewassers abhängig ('Temperatur-kompensiert'): Der Verlauf der Biolumineszenz (im schwachen Dauerlicht) ist bei verschiedenen Temperaturen dargestellt (oberste linke Kurve:  $26.8^{0}$ , mittlere linke Kurve:  $23.6^{0}$ , untere linke Kurve:  $16.5^{0}$ C. 26.8). y-Achse: Lichtintensität. Rechte Kurve: Periodenlänge (in Stunden) des Glimmrhythmus der Biolumineszenz von Gonyaulax in Abhängigkeit von der Temperatur des Mediums. Nach Hastings and Sweeney (1957). D048/t-tau-gony

sich durch zwei chemische Reaktionen mit gleicher Temperatur-Abhängigkeit erklären, bei denen das eine Reaktionsprodukt die andere Reaktion hemmt (Abbildung 16.9). Die Uhr wird auf diese Weise gegen Schwankungen der Umgebungstemperatur gepuffert.

#### 4.1.3 Präzision und Kommunikation

Der Biolumineszenzrhythmus ist sehr präzise. Er kann für die Population auf 2 Minuten pro Tag genau sein (0.015%) (Abbildung 4.7). Für die Einzelzelle beträgt die Variabilität der Periodenlänge 18 Minuten pro Tag (1.36%) (Njus et al. (1981), Morse et al. (1990)). Unter konstanten Bedingungen hält der Rhythmus der Biolumineszenz lange an; die Synchronie nimmt jedoch ab, wodurch die Maxima breiter werden.

Warum der Rhythmus erst allmählich ausdämpft, kann zwei verschiedene Gründe haben. Entweder sind die Periodenlängen der Uhren, die den Rhythmus treiben, sehr ähnlich. Dann kommt es erst nach längerer Zeit zu einer Dämpfung des Populationsrhythmus. Oder aber die Zellen kommunizieren miteinander und können sich gegenseitig synchronisieren. Gegen eine chemische Kommunikation sprechen Experimente, bei denen Kulturen mit verschiedenen Phasen miteinander gemischt wurden. Sie verhielten sich nach dem Mischen so, wie man es erwarten würde, wenn sie sich nicht gegenseitig beeinflussen (Sulzman et al. (1982)). Allerdings gibt es, wenn das Medium nicht gewechselt wird, nach 9 Tagen eine gegenseitige Synchronisation (Broda et al. (1985), Hastings et al. (1985)). Unter natürlichen Bedingungen im Meer würden sich die Algen nicht gegenseitig beeinflussen können, da das Medium ja durch die Wasserbewegung dauernd ausgetauscht wird.



Abbildung 4.7: Der circadiane Glimmrhythmus der Biolumineszenz von Gonyaulax polyedra wurde an einer Kultur bestimmt, die zunächst in einem 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel und einer konstanten Temperatur von  $19^{0}$ C gehalten wurde. Zum Zeitpunkt 0 (x-Achse) wurden die Algen in schwaches Dauerlicht überführt (oberer Teil der Abbildung). Die Präzision dieses Rhythmus wird im unteren Teil demonstriert. Hier ist die Uhrzeit der Biolumineszenz-Maxima gegen die Nummer der Maxima aufgetragen. Die Präzision ist noch höher, wenn man die Maxima der Biolumineszenz mit drei Geraden verbindet (die Ursache der beiden Phasenverschiebungen ist unbekannt). Nach Morse et al. (1990). D051/praction-gony

#### 4.1.4 Synchronisation durch Licht und Photorezeptoren

Wie bei den meisten Organismen ist Licht der stärkste Zeitgeber zum Synchronisieren der *Gonyaulax* Uhr. Licht beeinflusst außerdem die Periodenlänge des Biolumineszenz-Rhythmus. Wie, hängt von der Lichtqualität und der Lichtmenge ab: Unter rotem Dauerlicht ist sie länger als 24 Stunden und wird unter höherer Intensität noch länger. Unter blauem Dauerlicht ist sie kürzer und wird unter höherer Intensität noch kürzer (Abbildung 4.8). Außerdem ist im Rotlicht das Blitzen stärker als das Glimmen und überhaupt beide Lumineszenzarten stärker als im Weisslicht. Lichtpulse wäh-



Abbildung 4.8: Abhängigkeit der Periodenlänge (y-Achse) des Glimmrhythmus der Biolumineszenz von *Gonyaulax polyedra* von der Wellenlänge (rot, gelb, blau, weiss) und von der Intensität des Dauerlichtes (x-Achse). Nach Roenneberg and Hastings (1988). D052/taulambda-gony

rend schwachem Dauerlicht gegeben verschieben den Rhythmus. Eine Phasenresponskurve gibt die Reaktion wieder. Sie ist unsymmetrisch mit nur geringen Verzögerungen und stärkeren Verfrühungen (Abbildung 4.9). Für Tag-aktive Organismen ist das sinnvoll. Sie können sich so besser an die unterschiedlich langen Lichtperioden im Laufe des Jahres anpassen. Im Gegensatz zu sichtbarem Licht verschiebt UV-Licht den Rhythmus der Biolumineszenz nur nach vorn (verfrüht den Rhythmus, siehe Sweeney (1963)).



Abbildung 4.9: Phasenresponsekurve des Blitzrhythmus von Gonyaulax polyedra auf einen vierstündigen Blaulichtpuls von 175  $\mu$ Einstein/m<sup>2</sup>sec, der den Zellen im Rotlicht zu verschiedenen Phasen gegeben wurde. Die Phasenverschiebung (früher als die Kontrolle: über der Null-Linie, später als die Kontrolle: unter der Kontroll-Linie) hängt von der Phase (x-Achse) ab, zu dem der Lichtpuls gegeben wurde. CT: circadiane Zeit. Nach Johnson and Hastings (1989). D050/prc-gony

Das Aktionsspektrum zeigt Maxima im blauen (475 nm) und roten (650 nm) Spektralbereich (Hastings and Sweeney (1960)). Das könnte für Chlorophyll als dem verantwortlichen Photorezeptor sprechen. Jedoch wurde das experimentell ausgeschlossen. Auch Phytochrom ist nicht an der Synchronisation beteiligt. Offenbar sind zwei verschiedene Photorezeptoren beteiligt, aber um welche es sich handelt, ist noch unbekannt. Die Phasenverschiebung durch Lichtpulse kann durch Substanzen unterbunden werden, die die Atmung der Mitochondrien hemmen oder als H<sup>+</sup>-Ionophoren an Membranen der Mitochondrien und Chloroplasten wirken (Azid, DNP, Rotenon, CN).

#### 4.1.5 Chemische Kontrolle der Biolumineszenz

Wenn wir die rhythmische Kontrolle der Biolumineszenz verstehen wollen, ist es hilfreich, wenn wir wissen, wie dieses Phänomen sowohl physiologisch als auch biochemisch hervorgebracht wird. Hasting und seine Arbeitsgruppe haben sich sehr intensiv auch damit beschäftigt, und nicht nur mit der rhythmischen Kontrolle der Biolumineszenz. Es gibt aber immer noch offene Fragen.

Die Biolumineszenz findet in besonderen kugelförmigen Organellen, den Scintillons, statt. Sie haben einen Durchmesser von  $0.5\mu$  und ein Molekulargewicht von 10<sup>9</sup>. Während der Lichtperiode gibt es nur etwa 40xx Scintillons pro Zelle, während der Nacht etwa 40 (Fritz et al. (1990b), Johnson et al. (1985)). Scintillons haben eine dichte Matrix und liegen in der Nähe der Zellmembran (Abbildung 4.10). Sie ragen als Taschen in die Vakuole und sind mit dem Cytoskelett verbunden. Mit Bildverstärker und Video-Mikroskopie kann man eine blaue Biolumineszenz (470 nm Maximum) erkennen. Die Scintillons lassen sich auch mit Goldpartikeln über einen Antikörper für Luciferase immunocytochemisch nachweisen. Scintillon-Extrakte geben Lichtblitze ab, wenn sie von einem pH 8 in einen pH 6 gebracht werden. Die Scintillons haben auch eine Beziehung zum Cytoskelett.

Wie bei allen Biolumineszenz-Vorgängen besteht auch das Leuchten der *Gonyaulax*-Zellen aus einer Reaktion eines Substrates, Lucifer-



Abbildung 4.10: Scintillons sind Organellen der Biolumineszenz-Produktion bei Gonyaulax polyedra. Nachts enthält eine Zelle etwa 400, Tags nur etwa 40 Scintillons. Sie ragen aus dem Zytoplasma als Blasen des Tonoplasten in die Vakuole. Durchmesser etwa 0.5  $\mu m$ . Schütteln der Kultur oder andere Reizung der Zellen ruft ein Aktionspotential hervor. Dieses triggert einen  $H^+$ -Fluss aus der sauren Vakuole in das weniger saure Scintillon. Dadurch wird die Biolumineszenz initiiert (siehe Abbildung 4.13). Theka: Panzerplatte des Gehäuses. Nach Nicolas et al. (1985), Hastings and Dunlap (1986). E053/scintillon-gony

ins mit einem Enzym Luciferase.<sup>4</sup> Es gibt etwa  $2.7 * 10^{12}$  Luciferase-Moleküle pro Zelle. Das Luciferin ist bei *Gonyaulax* ein Tetrapyrrol, also ein kleines Molekül (MG<1000) (Abbildung 4.11). Es ist hitzestabil, während die Lucifera-



Abbildung 4.11: Tetrapyrrol-Struktur des Luciferin von *Gonyaulax polyedra*. Me: Methylgruppe. Nach Nakamura et al. (1989). 054/luciferingony

se hitzelabil ist. Durch Oxidation geht Luciferin unter Lichtabgabe in den Singlettzustand über. In den Scintillons befindet sich ferner Luciferin Binding Protein LBP. Es bindet Luciferin, wenn der pH 7.5 (der normale pH des Zytoplasma) oder höher ist. Bei einem pH von 6.5 oder niedriger ändert sich die Konfiguration des LBP, das Luciferin wird frei und reagiert mit  $O_2$  über die Luciferase. Niedriger pH aktiviert auch die Luciferase.

$$LBP - LH_2(pH7.5) \Rightarrow (H^+) LBP + LH_2(pH6) \Rightarrow (O_2, Lfase) \Rightarrow h\nu + L \Rightarrow O + H_2O$$

Circadian gesteuert werden die Translation des Luciferin-Bindeproteins, des Luciferins  $(LH_2)$ und der Luciferase (Morse et al. (1989))<sup>5</sup>. Die molekularen Grundlagen wurden von Mittag (1998) und ihrer Gruppe untersucht.

Diese translationale Kontrolle steht im Gegensatz zu der circadianen Steuerung bei den Cyanobakterien *Synechococcus* und zum Kreuzblütler *Arabidopsis*, bei denen die *Transkription* circadian geregelt ist.

Translations-kontrollierte regulatorische Uhr-Proteine (CP1, CP2, CP3) wurden als Bestandteile des circadianen Mechanismus vorgeschlagen (Abbildung 4.12). CP1 hebt die Repression der Synthese von CP2 auf, indem es mit dem Repressor der mRNA-2 interagiert. CP2 interagiert mit der regulatorischen Region von mRNA-3, die für die Synthese von CP3 zuständig ist. So findet eine Kaskade statt, bei der jedes Protein seine eigene Synthese hemmt, bis der Rhythmus beendet ist.

Die Luciferasekonzentration verläuft parallel zur Biolumineszenz intakter Zellen. Um Mitternacht ist sie 10 mal höher als mittags. Das Maximum ist 6 Stunden nach Dunkelbeginn. Im Dauerlicht läuft dieser Rhythmus mit geringerer Amplitude weiter. Der rhythmische Verlauf der Luciferase-Aktivität könnte zustande kommen, indem das Enzym durch Phosphorylierung, Methylierung, Aktivierung oder

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Luciferase hat bei einem pH von 8 ein Molekulargewicht von 140 kDa und ist ein Dimer (jedes von 70 kDa). Bei pH 6 ist das Molekulargewicht 35000 bis 40000. Bei einem pH von 6.4 ist es maximal aktiv. Eine 4.1 kb mRNA produziert die Luciferase. Die cDNA wurde kloniert. Sie enthält keine Introns und unterscheidet sich von allen bisher bekannten Luciferasen.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Die mRNA für LBP (2.5kb groß) ist dagegen konstant. Auch die Translationsfähigkeit der mRNA ist zu allen Phasen des Zyklus gleich. Der Rhythmus beruht also nicht auf unterschiedlicher Transkription. Er wird vielmehr translational gesteuert. Dementsprechend lässt sich der circadiane Rhythmus der Biolumineszenz durch Translationshemmer, aber nicht durch Transkriptionshemmer beeinflussen. Vielleicht spielen bei der LBP Synthese von der Uhr kontrollierte transagierende Faktoren (Dimer?) eine Rolle.



Abbildung 4.12: Translationale Uhr von *Gonyaulax polyedra*: Eine Kaskade der Uhrproteine (CP's) bildet den circadianen Rhythmus, wobei jedes Protein seine eigene Synthese hemmt (da die Synthese nur kurz sein darf). Die CP's sind Teile der Uhr. Davon muss man Proteine unterscheiden, die Uhr-kontrolliert sind. Nach A30 (n.d.). D055n/transl-gony

Hemmung modifiziert wird. Alternativ könnte die Enzymmenge circadian schwanken. Das wurde tatsächlich gefunden (Dunlap and Hastings (1981), Johnson et al. (1984)). Entweder schwankt also die Synthese oder der Abbau oder beides circadian.

Bei einer mechanischen oder chemischen  $(Ca^{2+}, NH_4, K^+, H^+)$  Reizung gibt es ein Aktionspotential. Dieses gelangt über den Tonoplasten an die Scintillons und depolarisiert diese. Dadurch gelangen  $H^+$ -Ionen in die Scintillons. Durch die rasche pH Änderung (von pH8 auf 6) gibt das LBP Luciferin ab und dieses reagiert mit der Luciferase. Es wird Licht abgegeben (Abbildung 4.13). Nach der Reizung wird Luciferin wieder an LBP gebunden und eine neue Reizung ist möglich (Fogel and Hastings (1971)). Möglicherweise beruhen die circadianen Schwankungen der Reaktionsteile darauf, dass die Scintillons in jedem Zyklus abgebaut und neu synthetisiert werden. Die spontane Biolumineszenz (Glimmrhythmus) findet vielleicht beim Abbau der Scintillons statt.

#### 4.1.6 Circadiane Kontrolle der Biolumineszenz, Mechanismus der Uhr

Wie sieht es nun mit der circadianen Kontrolle der Biolumineszenz aus, nachdem wir gesehen haben, wie die biochemische Maschinerie funktioniert? Die circadiane Uhr steuert tagesperiodisch die Synthese und (möglicherweise) den Abbau von Luciferin, Luciferase und LBP (Abbildung 4.14). Die *Aktivität* der Luciferase und der Phosphorylierungsgrad bleiben dagegen konstant.

Die Proteinsynthese ist am Biolumineszenz-Rhythmus beteiligt, da Hemmstoffe der Proteinsynthese (Cycloheximid, Puromycin, Anisomycin) die Periode beeinflussen (?). Cycloheximidpulse verschieben den Rhythmus der



Abbildung 4.14: Das Luciferin-Binde-Protein von *Gonyaulax polyedra* wird circadian rhythmisch synthetisiert (Maximum der Synthese etwa 35 Stunden nach Beginn des Dauerlichtes nach einem vorausgegangenen 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel). Das LBP Protein erreicht nach 43 Stunden ein Maximum der Konzentration. Danach wird es abgebaut. Die für die LBP-Synthese verantwortliche mRNA ist dauernd vorhanden und aktiv. Die circadiane Steuerung der LBP-Synthese erfolgt also auf translationaler Ebene. Nach Morse et al. (1990). D057/lbp-synth-gony



Abbildung 4.13: Mechanismus der Licht-Produktion bei Gonyaulax polyedra im Scintillon. Ein kleines Stück der Scintillon-Membran ist wiedergegeben (Vakuole wäre unten, das Innere des Scintillons oben). Wenn  $H^+$ -Ionen durch Depolarisation (zum Beispiel als Folge vom Schütteln) in das Scintillon gelangen (links), wird das Innere des Scintillons sauer. Dadurch wird das an das Luciferin-Bindeprotein angelagerte Luciferin abgelöst und von Luciferase oxidiert. Bei dieser Reaktion wird Licht abgegeben. Nach Dunlap et al. (1981). E056/biolum-gony

Biolumineszenz in Abhängigkeit von der Phase des Oszillators. Die Protein-Synthese beeinflusst also die Uhr (Schröder-Lorenz and Rensing (1987), siehe aber auch Thorey et al. (1987)). Wahrscheinlich sind hier, wie auch bei anderen tagesrhythmischen Systemen (NATF im Pineal, Tyrosinaminotransferase in der Leber, ß-hydroxy-ß methylglytaryl-CoA Reduktase), Enzyme mit kurzer Halblebenszeit (0.5 bis 1 Stunde) beteiligt, die die Stoffwechselraten begrenzen. Andere Enzyme haben eine Halblebensdauer von mehreren Tagen.

Mit Anisomycin konnte Arrhythmie induziert werden, und zwar auch auf dem Niveau der Einzelzelle (Taylor et al. (1982) und Abbildung 4.15). Das oszillierende System scheint aus zwei Zustandsvariablen zu bestehen. Die eine ist mit der Proteinsynthese an 80s Ribosomen verknüpft, die andere wird durch Licht (und Temperatur?) beeinflusst. Die Proteinsynthese spielt auch bei anderen Organismen für den circadianen Rhythmus eine Rolle: *Aplysia* (Jacklet (1981)), *Acetabularia* (Schweiger (1977)).

Details der circadianen Kontrolle der Biolumineszenz sind noch unbekannt. Es gibt aber einige Beobachtungen, die dafür sprechen, dass zwei Uhren beteiligt sind. Zum Beispiel können Phasenverschiebungen durch Lichtpulse den Blitz- und Glimmrhythmus unterschiedlich beeinflussen. Obwohl das gleiche Luciferin und die gleiche Luciferase verwendet werden, unterscheiden sich die verantwortlichen Reaktionen. Wahrscheinlich laufen sie in verschiedenen Kompartimenten ab. Unter bestimmten Bedingungen unterscheiden sich die Periodenlängen des Glimm- und Blitzrhythmus (23.8 versus 23.6 Stunden) und damit hat sich auch die Phasenbeziehung zwischen beiden Rhythmen geändert (Abbildung 4.16, Heyde et al. (1992)). Die optimale Lichtintensität ist für die beiden Biolumineszenzrhythmen unterschiedlich  $(6\mu Einstein/cm^2 sec$  für den Blitzrhythmus,  $(90\mu Einstein/cm^2 sec$  für den Glimmrhythmus). Die Temperatur beeinflusst Blitzund Glimmrhythmus unterschiedlich. Auch das spricht für zwei Uhren bei der Steuerung (Heyde et al. (1992), Morse et al. (1994)). Schließlich können auch der Biolumineszenzrhythmus und der Aggregationsrhythmus unterschiedliche Periodenlängen haben. Es gibt also gute Hinweise darauf, dass zwei Uhren das circadiane System von Gonyaulax steuern.



Abbildung 4.16: Unterschiedliche Periodenlängen des Blitz- und Glimmrhythmus von *Gonyaulax polyedra* werden im Dauerlicht bei 21<sup>o</sup>C gefunden. Die täglichen Maxima des Glimmrhythmus (offene Kreise) und des Blitzrhythmus (Punkte) wurden untereinander aufgetragen und mit einer Geraden verbunden. Die Periodenlänge des Glimmrhythmus beträgt 22.9, die des Blitzrhythmus 24.2 Stunden. Nach Heyde et al. (1992). D059/taus-gony



Abbildung 4.15: Induktion von Arrhythmie bei *Gonyaulax polyedra* durch einen Anisomycin-Puls von einer Stunde Dauer. Er wurde 12 Stunden nach Beginn des Dauerlichtes gegeben (dieser Zeitpunkt ist kritisch). Die Konzentration des Anisomycins wurde zwischen 100 und 1000 nM variiert (y-Achse, neben der Proben-Nummer). Bei einer kritischen Konzentration von 300 nM verschwindet der Biolumineszenz-Rhythmus. Nach Taylor et al. (1982). D058/ar-gony

#### 4.1.7 Bedeutung der Biolumineszenz

Welche Bedeutung hat die Biolumineszenz von Gonyaulax und anderen Dinoflagellaten? Im Organismenreich kommt Biolumineszenz oft vor (siehe dazu auch unter Spezialthemen Abschnitt 20 auf Seite 440). Offenbar haben ganz verschiedene Gründe dazu geführt: Männliche und weibliche Tiere können sich damit erkennen und finden (Glühwürmchen), Schwärme können gebildet werden, Territorien markiert werden. Fische können damit ihr Gesichtsfeld beleuchten und Beute anlocken (Anomalops in Japan). Biolumineszenz kann auch als Schutz dienen. Feinde können abgeschreckt werden, die Tiere können sich tarnen oder Feinde vom Vorderende ablenken (Würmer).

Aber warum zeigt Gonyaulax Biolumineszenz und warum gibt es einen Blitz- und Glimmrhythmus? Die Biolumineszenz könnte ein Nebenprodukt des Stoffwechsels sein. Sie dient vielleicht zum 'Verbraten' von Protonen, wenn zu wenig oder keine Akzeptoren für sie vorhanden sind. Für uns ist die Biolumineszenz sehr spektakulär, für die Alge dagegen nur ein Weg, um Elektronen loszuwerden. Andere Gründe wurden angeführt, warum sie Biolumineszenz besitzt. Sie könnte Fische, die nachts in einen Schwarm von Gonyaulax hinein schwimmen und dadurch plötzliche Biolumineszenz auslösen, erschrecken, sodass sie die Algen nicht fressen. Die Biolumineszenz könnte aber auch zur Synchronisation der einzelnen Zellen innerhalb der Population dienen. Das ist allerdings sehr unwahrscheinlich, wie Versuche zur gegenseitigen Synchronisation zeigten. Weitere Hypothesen wurden vorgeschlagen, warum Gonyaulax Biolumineszenz zeigt, aber keine ist sehr befriedigend und keine wurde geprüft.

Eine andere Frage ist, warum Scintillons und ihre Maschinerie eine so kurze Lebensdauer haben. Wird nicht Energie verschwendet, wenn sie täglich neu hergestellt werden müssen? Aber für eine Alge, der viel Energie zur Verfügung steht, ist es vorteilhafter, diese Organellen neu herzustellen und am Tage den Stickstoff der Scintillon-Proteine für andere Enzyme zu verwenden, weil Stickstoff bei ihr ein begrenzender Faktor ist. Um ein etwas weit her geholtes Beispiel zu geben: Für einen Europäer ist Energie teurer als Wasser, aber für einen Bewohner eines Öl-exportierenden Landes ist das Wasser teurer. Deshalb ist es für manche Organismen durchaus sinnvoll, wenn ihnen genügend Energie zur Verfügung steht, aber der Stickstoff limitierend ist, Enzyme abzubauen, die zu bestimmten Zeiten nicht gebraucht werden. Ein Enzym mit kurzer Halbwertszeit (2-3 Stunden) ist dabei geeigneter als eins mit der sonst üblichen langen Lebensdauer.

# 4.2 Rhythmen der Aggregation, Phototaxis, Vertikalwanderung und Mobilität

Bei Gonyaulax-Kulturen bilden die Zellen Schwärme. Sie können in Petrischalen beobachtet werden (Abbildung 4.17 und Roenneberg et al. (1989)). Dieses Verhalten stellt einen Populationsrhythmus dar, der drei Wochen endogen abläuft und dann desynchronisiert ist. Am Tage ist die Population mehr an der Oberfläche. Es ist noch unbekannt, welche individuellen Parameter (Mobilität, Vorzugs-Schwimmrichtung, Schweben, Unterschiede in der Mikroumwelt durch die Photosynthese) das Schwarmverhalten hervorrufen. Vielleicht beruhen auch die 'roten Tiden' des Phytoplanktons auf diesen Phänomenen. Chemische Signale scheinen keine Rolle zu spielen.

Der Aggregationsrhythmus ändert seine Periodenlänge mit der Lichtintensität. Allerdings hängt die Änderung von der Wellenlänge des Lichtes ab. Im Rotlicht steigt die Periode



Abbildung 4.17: Schwarmbildung bei Gonyaulax polyedra in einer Petrischale, die seitlich mit Licht von 120  $\mu E/m^2 sec$  bestrahlt werden. Am Tage bilden sich an der Oberfläche des Seewassers Schwärme, bei denen in der Mitte der Ansammlung die Zellen nach unten sinken und am Rande nach oben aufsteigen. In der Nacht setzen sich die Zellen in der ursprünglich dem Licht zugewandten Seite ab. Nach Roenneberg et al. (1989). E060/aggregation-gony

mit zunehmender Lichtintensität, im Blaulicht sinkt sie (Abbildung 4.18). Es wird vermutet, dass zwei verschiedene Photorezeptoren und möglicherweise auch zwei Uhren beteiligt sind (Roenneberg and Hastings (1988), Roenneberg and Morse (1993), Morse et al. (1996)). Dafür spricht, dass Lichtpulse die Biolumineszenz und die Aggregation unterschiedlich beeinflussen. Der B-Oszillator, der die Biolumineszenz steuert, reagiert auf blaues Licht, der A-Oszillator, der die Aggregation steuert, reagiert auf blaues *und* rotes Licht. Im Grünlicht (550 nm) sind die Zellen blind (Morse et al. (1994)).

Bei Gyrodinium dorsum und Gymnodinium splendens wurde eine rhythmische Phototaxis beobachtet (Sweeney (1984)). Das Maximum der Empfindlichkeit liegt bei 450 nm. Die rhythmische Vertikalwanderung (mit einem Minimum vor dem Licht-aus-Zeitpunkt) kann nicht allein durch Phototaxis erklärt werAbbildung 4.18: Das circadiane System von Gonyaulax soll aus einem A- und B-Oszillator bestehen. Der A-Oszillator (unten) kontrolliert unter anderem die Aggregation der Zellen, der B-Oszillator dagegen neben Zellteilung und Phototaxis die Biolumineszenz. Blaulicht synchronisiert den B-Oszillator, Blau- und Rotlicht den A-Oszillator. Nach Morse et al. (1994). E061/blau-rot-gony

den. Möglicherweise sind beide Rhythmen circadian.

Bei *Peridinium gregarium* gibt es einen Mobilitätsrhythmus. Nachts sind die Zellen bewegungslos und sinken deshalb auf den Grund. Bei *Gonyaulax* könnte das im Licht-Dunkel-Wechsel auch der Fall sein, im Dauerlicht gibt es aber keinen Rhythmus.

#### 4.3 Chloroplastenrhythmen

Wenn man Chloroplasten isolieren könnte, die noch einen circadianen Rhythmus zeigen, hätte man ein sehr geeignetes Minimalsystem zur Hand, das verschieden manipuliert werden könnte. Das ist leider bisher noch nicht möglich, aber in vivo wurden mehrere circadiane Änderungen an Chloroplasten beobachtet. Einige von ihnen wurden nicht an *Gonyaulax* gefunden, sondern an anderen Dinoflagellaten.

So ändern sich zum Beispiel die Chloroplastenzahl, -gestalt und Ultrastruktur circadian. Es gibt bei *Pyrocystis noctiluca* circadiane Bewegungen von Chloroplasten (Hardeland and Nord (1984) und Abbildung 4.19). In der Nacht



Abbildung 4.19: *Pyrocystis noctiluca* zeigt eine circadiane Chloroplastenbewegung im Dauerdunkel (Prozentsatz der Zellen, deren Chloroplast auf weniger als ein Viertel der Zelloberfläche ausgedehnt ist). Hohe Werte in der Nachtphase, niedrige in der Tagphase. Auf der rechten Seite sind Beispiele der roten Autofluoreszenz des Chloroplasten für die Nachtphase (oben), das Ende der Nachtphase (Mitte) und für die Tagphase (unten) gezeigt. Nach Hardeland and Nord (1984). D065/chloro-pyro

sind die Chloroplasten im Zentrum der Zelle zusammengezogen, am Tage dagegen ausgebreitet. Auch bei *Pyrocystis lunula* ändert sich die Lage der Chloroplasten circadian: Hier ziehen sie sich in der Nacht in die Spitzen der Zelle zurück, während sie am Tage im Zentrum liegen (Hardeland and Nord (1984) und Abbildung 4.20, siehe auch Kapitel 5). Im Dauerlicht beträgt die Periode 21 bis 23 h. Der Rhythmus verschwindet aber im Dauerlicht mit Intensitäten über 100 Lux. Die Ultrastruktur der Chloroplasten schwankt circadian (Seo and Fritz (2000)). Plastidenbewegungen von *Pyrocystis acuta* stehen ebenfalls unter circadianer Kontrolle (Hardeland (1995)). Circadiane Un-



Abbildung 4.20: Die Chloroplasten von *Pyrocystis lunula* ändern ihre Lage circadian. Vom expandierten Zustand des Tages (links) ziehen sie sich in der Nacht in die cytoplasmatischen Stränge der vier Hörner zurück (rechts). Aufnahmen von Hardeland. 066/chloro-form-pyro

terschiede finden sich auch in der Ultrastruktur subzellulärer Strukturen wie die Thylakoidanordnung in den Chloroplasten von Gonyaulax (Abbildung 4.21). In der subjektiven Nacht (CT 18) liegen die Thylakoide enger zusammen (oberer Teil der Abbildung) als am subjektiven Tag (CT6, unterer Teil der Abbildung) (Herman and Sweeney (1975)). Am subjektiven Tag haben die Thylakoide zwei Lamellen, in der subjektiven Nacht drei.

Die photosynthetischen Einheiten in der Thylakoidmembran unterscheiden sich: In der subjektiven Nacht ist ein Teil von der Elektronenübertragung entkoppelt. Die Assoziation und Dissoziation der Antennen des Photosystems II schwankt rhythmisch. Dadurch wird die Erregungsenergie zwischen Photosystem I und Photosystem II unterschiedlich verteilt. Samuelsson et al. (1983) untersuchten die Ursache der circadianen Sauerstoffproduktion. Sie fanden mit dem Elektronenakzeptor Methylviologen, dass der Elektronenfluß im Photosystem I kon-

Abbildung 4.21: Die Thylakoide in den Chloroplasten von *Gonyaulax polyedra* zeigen circadiane Unterschiede. In der subjektiven Nacht (CT 18) liegen sie enger zusammen (oberer Teil der Abbildung) als am subjektiven Tag (CT6, unterer Teil der Abbildung). Nach Herman and Sweeney (1975). E067/thyla-gony stant ist, aber in Photosystem I und II circadian schwankt. Demnach sind nur Änderungen im Photosystem II für den Photosyntheserhythmus von Gonyaulax verantwortlich (Abbildung 4.22, siehe auch nächsten Abschnitt).



Abbildung 4.22: Grundlagen des Rhythmus bei Photosynthese-Gonyaulax polyedra. Die Photosynthese (grüne Kurve) circadian (Sauerstoffproduktion schwankt gemessen). Sie hat niedrige Werte in der Nachtphase, wenn die Biolumineszenz hoch ist (rote Kurve). Mit dem Elektronenakzeptor Methylviologen wurde gezeigt, dass der Elektronenfluß im Photosystem I konstant ist (schwarze Gerade), aber in Photosystem I und II circadian schwankt (blaue Kurve). Demnach sind nur Änderungen im Photosystem II für den Photosyntheserhythmus von Gonyaulax verantwortlich. Die x-Achse gibt circadiane Zeit CT wieder. Die Meßgrößen sind nicht auf der v-Achse angegeben. Siehe dazu die Referenz Samuelsson et al. (1983). D068/ps-gony

# 4.4 Circadiane Rhythmen in der Photosynthese

Strukturelle Änderungen im Photosyntheseapparat zeigten bereits, dass circadiane Rhythmen die Photosynthese beeinflussen. Eine Reihe von Vorgängen sind bei *Gonyaulax* beteiligt:  $CO_2$ -Aufnahme (Hastings et al. (1961)), Lichtreaktionen im Photosystem II<sup>6</sup>, Chlorophyllfluoreszenz und -Abbau<sup>7</sup> sind Beispiele. Photosynthese ist aber nicht ein Bestandteil der Uhr: Wird sie mit DCMU gehemmt (blockiert den Elektronenfluss im Photosystem II), läuft die Uhr trotzdem weiter (Sweeney et al. (1979)).

 $CO_2$ -fixierende Enzyme zeigen keinen Rhythmus. Auch die  $O_2$  *Aufnahme* ist konstant. Die Atmung ist daher nicht für den circadianen Rhythmus verantwortlich. In der Mitte der subjektiven Lichtperiode ist die  $O_2$  *Abgabe* hoch, in der Mitte der subjektiven Dunkelperiode niedrig (Abbildung 4.23).

Da sich die Dichte einer Zelle mit der Photosynthese ändert, konnte mit Hilfe eines Cartesischen Tauchers ein circadianer Rhythmus in einer einzelnen *Gonyaulax*-Zelle nachgewiesen werden (Abbildung 4.24, Sweeney (1960b)). Auch hier verschwindet der Rhythmus bei hoher Lichtintensität. Die Dämpfung beruht also nicht auf einer Desynchronisation der Rhythmen zwischen den Einzelzellen einer Population.



Abbildung 4.23: Photosynthetische Kapazität bei Gonyaulax polyedra (grüne Kurve): Proben wurden zu verschiedenen Phasen für 15 Minuten während Starklicht mit  $C^{14}O_2$  begast. Es wurde bestimmt, wie viel  $C^{14}$  aufgenommen wurde. Zusätzlich wurde der Verlauf der Biolumineszenz dargestellt (rote Kurve). Nach Hastings et al. (1961). D062/ps-r-gony



carthes-gony | D063 | 17.4.2002

Abbildung 4.24: Der Verlauf der Photosynthese einer einzelnen *Gonyaulax*-Zelle wurde während der Lichtperiode mit einem Cartesischen Taucher bestimmt. Die Dichte der Zelle hängt von der Sauerstoffproduktion ab. Damit ändert sich die Position des Cartesischen Tauchers (in dem sich die Zelle befindet) im Gefäß. Nach Sweeney (1960a). D063/carthes-gony

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>Die Quantenausbeute der Photosynthese und der Elektronenfluss durch das Photosystem II von *Gonyaulax* schwankt im schwachen Dauerlicht periodisch. Das ist auch der Fall, wenn der Elektronenfluss vom Photosystem I entkoppelt wurde. Das entkoppelte Photosystem I dagegen zeigt keine circadianen Schwankungen im Elektronenfluss.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup>Der Abbau des Chlorophylls ist am Tage geringer als in der Nacht. Circadiane Ionenflüsse durch die Thylakoidmembranen sind daran beteiligt (Sweeney (1981b)). Das Antennensystem des Photosystems II und die Anordnung der Antennenpigmente scheinen sich circadian zu ändern (Knoetzel and Rensing (1990a,b)).

#### 4.5 Zellteilung

Die Zellteilung ist für Organismen äußerst wichtig. Um sich zu vervielfältigen, müssen sich Zellen teilen. Die Länge des Zellzyklus wird hauptsächlich durch die  $G_1$  Phase bestimmt. Der Zyklus kann irgendwo zwischen 8 Stunden und 100 Tagen liegen. Wenn der 'restriction point' erreicht ist oder induziert wurde, muss der Zellzyklus ablaufen. S-Phase (DNA-Synthese, DNA-Verdopplung),  $G_2$  Phase (Vorbereitung zur Mitose) und M-Phase (Mitose, also Teilung des Kerns und Cytokinese) laufen ab, bis die Tochterzellen sich gebildet haben.

Die Zellteilung erfolgt in einer Population von Gonyaulax im Licht-Dunkel-Wechsel vor allem am Morgen und im Dauerlicht am subjektiven Morgen (wenn also eigentlich Licht beginnen würde). Sie ist also circadian kontrolliert. Die Generationsdauer einer Zelle dauert unter der verwendeten Lichtintensität im Schnitt 6-7 Tage (Abbildung 4.25, Sweeney (1984)).



Abbildung 4.25: Circadianer Rhythmus der Zellteilung von Gonyaulax polyedra: Die Zahl der Zellen pro  $\mu l$  nimmt trotz Dauerlicht (von 3000 Lux) nicht kontinuierlich, sondern stufenförmig zu. Auf der x-Achse ist die circadiane Zeit CT aufgetragen. Periodenlänge ist etwa 24 Stunden. Nach Vicker et al. (1988). D069/ztgony Der Zellteilungszyklus einer Zelle stellt also keinen eigenen circadianen Rhythmus dar, sondern wird nur von der circadianen Uhr gesteuert (Sweeney and Hastings (1958)). Das erfolgt durch 'gating', also Zellteilungen zu bestimmten Zeitfenstern (Vicker et al. (1988)). Mitosen finden sich im allgemeinen gegen Ende der Dunkelperiode oder etwas früher, bei Gymnodinium splendens allerdings am frühen Abend. Die Cytokinese dauert bei Gonyaulax eine Stunde. Bei Pyrocystis fusiformis, einem bewegungslosen Dinoflagellat, mit einem 4-5 tägigen Zellzyklus, läuft parallel zum Zellzyklus ein Formwechsel ab (Sweeney (1981a)). Der Zellteilungsrhythmus ist nicht mit dem Biolumineszenzrhythmus verbunden: Zellen, die sich nicht teilen, zeigen noch eine circadiane Biolumineszenz, und Colchizin-behandelte Zellen ebenfalls.

Der Zellzyklus kann synchronisiert werden, indem die Zellen nach Größe ausgesiebt werden (Homma and Hastings (1988), Homma and Hastings (1989)). Nach der Zellteilung wird die Phase des circadianen Rhythmus auf die Tochterzellen übertragen (Homma et al. (1990)).

Unter optimalen Bedingungen wird die Zellteilung (untersucht an *Euglena* und *Chlamydomonas*) allein vom Teilungsmechanismus bestimmt. Bei suboptimalen Bedingungen steuert eine ultradiane Uhr die Teilung (Lloyd and Volkov (1990)). Unter Bedingungen, die nur langsames Wachsen erlauben, kommt dann die circadiane Uhr zum Tragen (*gating*, Lloyd and Gilbert (1998)). Verschiedene Modelle wurden vorgeschlagen, um den Zellzyklus und seine zeitliche Steuerung zu simulieren. (Tyson (1987), Übersicht Lloyd and Gilbert (1998)).


Abbildung 4.26: Circadianer Rhythmus der Nitrat-Reduktase (oben) und der Superoxiddismutase bei Gonyaulax polyedra. Oben links: Im Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 Stunden Weisslicht von 150  $\mu E/m^2 sec$ , rechts im Dauerlicht (Stunden nach Beginn des Dauerlichtes 35  $\mu E/m^2 sec$ ). Aktivität der Nitrat-Reduktase in relativen Einheiten pro mg. Nach Ramalho et al. (1995). Die Superoxiddismutase (unten) zeigt hohe Aktivität in der Lichtperiode. In der Dunkelperiode sinkt die Aktivität und erreicht ein Minimum am Ende der Nacht. Im anschließenden Dauerlicht setzt sich dieser Rhythmus fort. Er ist also circadian. Nach Colepicolo et al. (1992). E070/emzym-rgony

## 4.6 Circadiane Rhythmen von 4.7 Enzymen

Circadiane Rhythmen wurden bei einer Reihe von Enzymen von Gonyaulax gefunden. Die Nitrat-Reduktase gehört dazu (Abbildung 4.26 und Ramalho et al. (1995), Fritz et al. (1996)). Sie ist das erste Enzym des Stickstoff-Assimilationsweges und wandelt Nitrat in Nitrit um. Ihre Konzentration schwankt circadian mit einem Maximum in der (subjektiven) Tagphase. Ein anderes Enzym, die Superoxiddismutase, hat ihre höchste Aktivität ebenfalls zur Tagphase (Abbildung 4.26 und Colepicolo et al. (1992)). Ob ihre Konzentration circadian schwankt, ist nicht bekannt. Dieses Enzym ist ein Superoxide-Anionen-Fänger ('scavenger'). Im Fall der RUBISCO, dem häufigsten Enzym der Biosphäre, weil es CO<sub>2</sub> während der Photosynthese fixiert, schwankt die Aktivität circadian, während die Menge des Enzyms konstant bleibt (Marcovic et al. (1996)). Im Gegensatz zu diesen Enzymen hat die Tyrosin-Aminotransferase ihre höchste Aktivität in der Nacht (Gross et al. (1994)). Das war auch der Fall beim Enzym Luciferase, die am Biolumineszenzrhythmus beteiligt ist (Dunlap and Hastings (1981), Johnson et al. (1984). Generell ist die Proteinsynthese in der Tag-Phase höher als nachts. Die meisten Hitzeschock-Proteine haben eine konstante Synthese, aber bei einigen schwankt sie circadian mit einem Maximum um CT15. Ribosomale Proteine werden circadian phosphoryliert (Esch et al. (1995)). Wird die Proteinphosphorylierung mit 6DMAP gehemmt, wird die Periode verlängert. Bei höheren Konzentrationen verschwindet der Rhythmus (Comoli et al. (1994)).

## on 4.7 Wirkung von Substanzen auf den circadianen Rhythmus, Membranen

Verschiedene Substanzen beeinflussen den circadianen Rhythmus von Gonyaulax. Wie bereits erwähnt, ist die Proteinsynthese am Mechanismus der circadianen Uhr beteiligt. Aber Membranen scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Das ist interessant, da die Fluidität von Membranen Temperaturkompensiert ist. Man könnte auf diese Weise die Temperatur-Kompensation der Periodenlänge circadianer Rhythmen erklären (siehe auch 5.6). Membranaktive Substanzen wie  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $D_2O$ , Valinomycin (Sweeney (1974b)), Alkohole (Sweeney and Herz (1977), Taylor et al. (1979)), Vanillinsäure (depolarisiert Membranen, Kiessig et al. (1979)) beeinflussen circadiane Rhythmen. Auch das spricht für die Bedeutung von Membranen für circadiane Rhythmen. Allerdings könnte es sich auch um Stoffwechselunterschiede handeln oder die Proteinsynthese könnte beeinflusst sein. Als Test wurden Membraneigenschaften geändert und mit Fluoreszenzpolarisationstechniken gemessen. Dabei ergaben sich keine Korrelationen zwischen Membranen und der Periodenlänge (Scholübbers et al. (1984)). Die Aktivität von Membran-gebundenen Enzymen und Membranpotentiale könnten sich aber rhythmisch ändern.

Andere Substanzen wie Acetaldehyd (Taylor and Hastings (1979)) und Catecholamin (Hardeland (1980)) beeinflussen ebenfalls den Rhythmus, während Atmungshemmer, Photosynthesehemmer (Sweeney (1981b)), Hemmstoffe der Organellen-Ribosomen, cAMP und DNA-Synthese keine Rolle spielen.

Creatin, eine Speicherform des ATP und Überträger von Energie-reichem Phosphat zwischen Mitochondrien und Energie-verbrauchenden Stellen, verkürzt die Periode von 23 auf 18 Stunden (Abbildung 4.27, Roenneberg et al. (1988), Roenneberg and Taylor (1994)). Es verstärkt den Phasen-verschiebenden Effekt von Blaulicht und die Phototaxis. Creatin scheint jedoch in *Gonyaulax* nicht natürlich vorzukommen. Stattdessen gibt es eine andere Substanz, Gonyaulin, welche die Periode verkürzt<sup>8</sup> (Roenneberg et al. (1988), Roenneberg et al. (1991)).

## 4.8 Rhythmen bei weiteren Dinoflagellaten

Circadiane Rhythmen kommen bei einer Reihe weiterer Dinoflagellaten vor. Einige von ihnen wurden bereits erwähnt. Es wäre für vergleichende Zwecke wünschenswert und nützlich, ihre Rhythmen näher zu untersuchen.

Biolumineszenz wurde auch bei Ceratocorys horrida gefunden (Latz and Lee (1995)). Sie verläuft ähnlich wie bei Gonyaulax polyedra, aber das Blitzen und die dabei abgegebene Lichtmenge ist stärker. Bei Pyrocystis lunula (Swift and Taylor (1967)) gibt es ebenfalls einen Blitz- und Glimm-Rhythmus, der stärker ist als bei Gonyaulax polyedra und empfindlicher auf Licht reagiert. Der Glimmrhythmus wird aber nicht circadian gesteuert. Offenbar ist hier die physiologische Steuerung der Luciferase anders als bei Gonyaulax polyedra (Colepicolo et al. (1993)).

Auch bei *Pyrocystis fusiformis* (Sweeney (1981a)) ist die Biolumineszenz circadian geregelt. Sie ist stärker als bei *Gonyaulax*. Auch bei *Pyrocystis* hängt die Periodenlänge von der Lichtqualität (rot, blau) und der Lichtintensität ab (Colepicolo et al. (1993)). Auch die Photosynthese, die Zellteilung und die Bewegung von Chloroplasten sind circadian kontrolliert (Sweeney (1981a)).

 $<sup>^8 {\</sup>rm Gonyaulin}$ hat eine Struktur, die einem Vorläufer von Ethylen ähnelt





Abbildung 4.27: Wirkung von 5 bis 10  $\mu$ M Creatin auf die Periodenlänge des Biolumineszenz-Rhythmus von *Gonyaulax polyedra*. Die Algen wurden zunächst in einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel (Lichtintensität 100  $\mu E/m^2 sec$ ) und dann im Dauerlicht (40  $\mu E/m^2 sec$ ) gehalten. Mit steigender Konzentration des Creatins wird die Periode zunehmend verkürzt (vergleiche die Lage der Kreuze, die das neunte Biolumineszenz-Maximum markieren. Die Zeit im Dauerlicht ist auf der x-Achse aufgetragen (in Stunden). Chemische Formel des Creatins oben rechts. Nach Roenneberg et al. (1988). D071/creatin-gony

## Kapitel 5

# Rhythmen bei Algen: Acetabularia

Acetabularia ist eine weitere Alge, bei der mehrere circadiane Rhythmen beobachtet werden können. Auf Grund ihrer außergewöhnlichen Größe können auch Rhythmen an Teilen dieser einzelligen Alge untersucht werden. Pfropfungen können ebenfalls durchgeführt werden. Durch sie kann man versuchen, herauszubekommen, welche Bedeutung der Kern für die circadiane Uhr hat. Sauerstoffproduktion, Chloroplastenwanderung und elektrische Potentiale wurden als Zeiger der Uhr verwendet. Ein Modell des circadianen Mechanismus wurde vorgeschlagen und getestet.

Eine andere Alge, die circadiane Rhythmen besitzt, wurde wegen ihrer außergewöhnlichen Größe intensiv untersucht. Es handelt sich um Acetabularia. Diese Schirmalge gehört zu den Dasycladaceae, eine sehr alte Familie, die bereits vor 500 Millionen Jahren existierte. Je nach Art ist diese einzellige Alge wenige mm bis 25 cm groß (letztere ist Acetabularia major in der Torres Straße Australiens und in Papua-Neuguinea). Die Algen sind schlauchförmig gebaut und besitzen ein wurzelartiges Rhizoid. Im ausgebildeten Zustand besitzen sie einen Hut ("umbrella" italienisch, "meermaids wineglass" in den USA, Abbildung 5.1). Die meisten Acetabularien kommen in flachen Bereichen der Küsten tropischer und subtropischer Meere vor.



Abbildung 5.1: Einzellige Schirmalge Acetabularia mediterranea in der generativen Phase, mit Rhizoid, Stiel und Hut. Etwa 50 mm lang. Sie kommt im Mittelmeer und dem westlichen Atlantik vor. Nach Schweiger (1984). 072/acetabularia

### 5.1 Tagesrhythmische Phäno- 5.2 Registriermethoden. mene

Im Labor kann Acetabularia in künstlichem Seewasser gehalten und Untersuchungen an ihr durchgeführt werden. Auf diese Weise wurden Tagesrhythmen der Sauerstoffproduktion während der Photosynthese (Terborgh and McLeod (1967)), von Enzymaktivitäten (Hellebust et al. (1967))), der Chloroplastenwanderung und elektrischer Potentiale gefunden (Schweiger (1977), Broda and Schweiger (1981), Koop et al. (1978)).

Da der Kern im Fuß der Alge sitzt, konnte man Pfropfexperimente machen, um die Bedeutung des Kernes für die Tagesrhythmik zu untersuchen (Schweiger (1977)).

Die Rhythmen lassen sich durch Licht-Dunkel-Wechsel synchronisieren. Lichtpulse und Dunkelpulse verschieben die Phase des Rhythmus. Blaulicht ist besonders wirksam. Es stößt auch den circadianen Rhythmus im elektrischen Potential und bei der Chloroplastenwanderung nach Dauerdunkelbehandlung wieder an (Borghi and et al. (1986)). Auch die Zahl, Form und Ultrastruktur der Chloroplasten ändert sich tagesperiodisch (rund in der Dunkelperiode, oval in der Lichtperiode, siehe Vanden Driessche et al. (1976) und dazu auch unter Spezialthemen Abschnitt 20, Formänderungen von Chloroplasten auf Seite 455). Ferner schwankt die RNA-Synthese circadian (Vanden Driessche and Bonotto (1969)). Die circadianen Rhythmen sind Temperatur-kompensiert mit einem  $Q_{10} < 1$  (Karakashian and Schweiger (1976), Berger et al. (1992)). Schweiger and et al. (1986) zeigten, dass die circadiane Chloroplastenwanderung durch eine 8stündige Dunkelperiode gelegentlich verschoben wird, der Rhythmus des elektrischen Potentials jedoch nicht. Das würde für zwei Uhren sprechen.

Die Photosynthese wurde an Acetabularia durch die Sauerstoffproduktion gemessen. Dazu wurde eine polarografische Methode verwendet (Mergenhagen and Schweiger (1975a)). Die Platin-Elektrode steckt im Seewasser, durch das Luft aus einem Gefäß mit einer einzelnen Alge strömt. Je nach dem Sauerstoffgehalt ändert sich die Spannung, die registriert werden kann (Abbildung 5.2). Eine automatische Registrieranlage wurde entwickelt (Broda and Schweiger (1981), Schweiger et al. (1983)), mit der 60 Acetabularia gleichzeitig alle 20 Minuten gemessen werden können. Die Daten wurden per Computer gespeichert, dargestellt und analysiert. Die Messungen zeigen tagesperiodische Änderungen. Sie beruhen auf einem circadianen Rhythmus der Photosynthese. Der  $O_2$ Rhythmus ist auch im Dauerlicht zu beobachten. Das elektrische Potential der Zellen wurde mit einer Mikroelektrode gemessen, verstärkt und über einen Schreiber oder mit einer automatischen Langzeit-Registrieranlage mit einem Computer gemessen (Broda and Schweiger (1981)). Es schwankt tagesperiodisch.

Die Chloroplasten wandern in der Nacht zum Rhizoid am Fuß der Alge und am Tage zu den oberen Teilen der Alge. Auch dieses Phänomen wird circadian gesteuert. Es lässt sich unter dem Mikroskop beobachten und mit Hilfe von Lichtschranken photoelektrisch automatisch registrieren (Koop et al. (1978), Broda (1979)). Das gleiche gilt für die Form der Chloroplasten (Vanden Driessche (1966), Vanden Driessche (1967b)).

## 5.3 Bedeutung des Kernes für den circadianen Rhythmus

Wegen ihrer Größe können Acetabularien für Versuche benutzt werden, die sich mit ande-



Abbildung 5.2: Die Acetabularia-Alge befindet sich in einem Glasgefäß und wird ständig über eine Pumpe mit neuem Seewasser versorgt. Der Sauerstoffgehalt des Wassers wird vor und hinter der Alge mit je einer Sauerstoffelektrode gemessen. Die Differenz der Werte wird verstärkt und über einen PC registriert. Nach Schweiger (1984). E073/o2-messen-acetabularia

ren Objekten nur schwer oder gar nicht durchführen lassen. Zum Beispiel kann die Rolle des Kerns für den circadianen Mechanismus untersucht werden. Die Zelle kann während der vegetativen Phase leicht entkern werden. Da sich der Kern zu dieser Zeit im Rhizoid befindet, braucht man dieses nur abzuschneiden. Der Kern einer anderen Zelle kann gewaschen und in ein kernfreies Zellfragment implantiert werden (Hämmerling (1963)).

Die Rolle des Kernes für den circadianen Rhythmus wurde von Sweeney and Haxo (1961), Schweiger et al. (1964), von Karakashian and Schweiger (1976) und besonders eingehend von Terborgh and McLeod (1967) näher untersucht. Die O<sub>2</sub>-Produktion bei der Photosynthese ist auch ohne Zellkern rhythmisch (Abbildung 5.3). Der circadiane Rhythmus ist im kernlosen und kernhaltigen Teil weiterhin zu beobachten. Also befindet sich der Oszillator im Cytoplasma. Die Integrität der Zelle ist für den circadianen Rhythmus nicht nötig. Auch kleinere Zellfragmente zeigen noch einen circadianen Rhythmus. Warum ist das so? Es zeigte sich, dass die mRNA von Acetabularia besonders dann, wenn der Kern fehlt, für Wochen stabil ist.

Der Kern spielt jedoch eine Rolle: Pfropft man Rhizoide von Acetabularien auf Stiele von Algen mit phasenverschobenem Rhythmus der O<sub>2</sub>-Produktion, wird deren Rhythmus im Dauerlicht vom Kern-haltigen Rhizoid bestimmt (Abbildung 5.4, Schweiger et al. (1964)). Um cytoplasmatische Effekte (wie beispielsweise mRNA) auszuschließen, wurden nur Zellkerne phasenverschoben synchronisierter Algen implantiert. Auch hier wurde der Rhythmus vom Kern bestimmt. Werden Rhizoid und oberer Teil einer Acetabularia unterschiedlichen Licht-Dunkel-Wechseln ausgesetzt, wird der Rhythmus der  $O_2$ -Produktion so eingestellt, wie das Rhizoid beleuchtet wurde. Vanden Driessche (1967a) pfropfte arrhythmische Stiele von Acetabularia auf Rhizoide rhythmischer Algen. Es konnte danach wieder ein Rhythmus der  $O_2$ -Produktion beobachtet werden.

Es zeigt sich also ein Paradoxon: Obwohl eine Acetabularia auch ohne Zellkern einen circadianen Rhythmus zeigt, wird nach diesen Autoren die Phase durch den Zellkern determiniert.

#### 5.3.1 Translations-Membran Modell von Schweiger

Da auch kernlose Acetabularien circadian Photosynthese betreiben, ist offenbar keine kontinuierliche Transkription des Kerngenoms für die Schwingungen nötig. Dafür spricht auch, dass ein Hermmstoff der Transkription im Kern, Actinomycin, den Rhythmus der Algen nicht unterbindet (Mergenhagen and Schweiger (1975b)). Hemmstoffe der Transkription in Organellen wie Rifampicin haben ebenfalls keinen Einfluss auf den circadianen Rhythmus (Mergenhagen and Schweiger (1975b), Vanden Driessche (1970)). Dagegen ist für den Ablauf des circadianen Rhythmus die Translation nötig, da Hemmstoffe wie Cycloheximid die circadiane Oszillation unterbinden (Mergenhagen and Schweiger (1975b), Karakashian and Schweiger (1976)).

Aus diesen Beobachtungen leitete Schweiger ein Translations-Membran Modell ab (Abbildung 5.5). Zentrale Komponenten des Oszillators sind essentielle Membranproteine in den Thylakoiden der Chloroplasten. Sie beeinflussen die Permeabilität für Ionen. Durch Rückkopplung wird dadurch die Translation des Membranproteins an 80s Ribosomen gehemmt. Die Membranproteine werden allmählich abgebaut und damit ändert sich die Permeabilität für Ionen. Die Hemmung der Translation hört auf.

Welche Experimente unterstützen dieses Modell und wie werden damit bestimmte Eigen-



Abbildung 5.3:  $O_2$  Rhythmus vor (bis Pfeil) und nach Fragmentierung einer Acetabularia mediterranea Zelle in einen kernlosen apikalen (obere Kurve hinter dem Pfeil) und einen kernhaltigen basalen Teil (untere Kurve hinter dem Pfeil). Nach Schweiger (1984). D074/o2-kernlosacetabularia

schaften der circadianen Uhr wie Temperaturkompensation erklärt? Hartwig and Schweiger (1986) fanden ein Kern-kodiertes Protein P230 in der Chloroplastenfraktion kernhaltiger und kernloser *Acetabularien*. Es wird unter Konstantbedingungen circadian synthetisiert. Durch Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinsynthese an 80s Ribosomen, kann seine Translation Phasen-abhängig gehemmt werden. Cycloheximid verschiebt außerdem den circadianen Rhythmus der Photosynthese je nach der Phase, zu der es gegeben wurde. Es könnte sich also dabei um ein essentielles Protein des Modells handeln.

Die Temperaturkompensation des circadianen Rhythmus soll nach diesem Modell folgendermaßen zustandekommen (siehe Abbildung 5.6): Die Translation der essentiellen Membranproteine an 80s Ribosomen hat einen  $Q_{10}$  von 2-3, die Integration des Proteins in die Membranen der Chloroplasten aber einen  $Q_{10}$  von weniger als 1 (wegen des geringeren Ordnungszustandes bei höherer Temperatur ist auch die Integration schwieriger). Woolum (1991) überprüfte die Ergebnisse an kernhaltigen und kernlosen Acetabularien. Er benutzte statt der  $O_2$ -Abgabe die circadiane Chloroplastenbewegung im Rhizoid mit Lichtschranken, wie von Schmid and Koop (1983) beschrieben (Abbildung 5.7).

Statt zwei Messwerten pro Tag wie bei Schweiger et al. (1964) wurde hier jede Minute ein Messwert erhalten und über eine Stunde gemittelt. Algen mit Rhizoid zeigten eine Periodenlänge von 25.4 Stunden unter Konstantbedingungen, Algen ohne Rhizoid 26.2 h. Der Kern beeinflusst also sehr wohl den Rhythmus, wenn auch in geringem Maße. Kontrollen zeigen Phasenunterschiede bis zu 4 Stunden zueinander. Woolum konnte mit unterschiedlicher Beleuchtung des oberen Teils der Algen und des Rhizoids die Ergebnisse von Schweiger nicht reproduzieren. Der Kern gab keine Phaseninformation



Abbildung 5.4: Zwei Acetabularia Algen wurden in inversen Licht-Dunkel-Zyklen gehalten (siehe LD 12:12 und die schwarzen und weißen Balken vor der Transplantation über und unter den Acetabularien). Das Rhizoid mit dem (in der Abbildung rot markierten) Kern von (a) wurde mit dem Stiel von (b) gepfropft, auf das Rhizoid von (b) wurde der Stiel von (a) gepfropft. Die nach drei Tagen begonnenen Messungen zeigen gegenläufige Rhythmen. Vergleiche mit Kontrollen (nicht dargestellt) zeigen, dass der Kern die Phasenlage des Pfropfproduktes bestimmt. Nach Schweiger et al. (1964). D075/pfropfen-acetabularia



Abbildung 5.5: Translations-Membran-Modell des circadianen Mechanismus von Acetabularia von Schweiger und Schweiger. Essentielle Proteine werden durch 80s Ribosomen hergestellt und über das Cytosol in die Chloroplasten transportiert. Dort werden sie in die Thylakoid-Membranen eingebaut. Nach dem Beladen wird die Proteinsynthese gehemmt, die essentiellen Proteine abgebaut, bis die Thylakoide entladen sind. Jetzt kann der Zusammenbau (linker Teil der Abbildung) wieder beginnen. Nach Engelmann and Schrempf (1979). E076/modell-acetabularia



temp-komp-acetabula | D077 | 17.4.2002

Abbildung 5.6: Temperaturkompensation des circadianen Rhythmus von *Acetabularia*. Bei hoher Temperatur verläuft die Synthese der essentiellen Proteine rascher, die Integration in die Thylakoide aber langsamer. Bei niedriger Temperatur ist die Synthese verlangsamt, die Integration aber beschleunigt. Auf diese Weise ist die Länge der Periode nur wenig von der Temperatur abhängig. Nach Engelmann and Schrempf (1979). D077/temp-compacetabularia



Abbildung 5.7: Circadiane Chloroplastenwanderung einer Acetabularia mediterranea Zelle. Am Tage im Hut und oberen Stiel angereichert (links), nachts im Rhizoid und unteren Teil des Stiels. Nach Schweiger (1984). E078/chloroacetabularia

an den oberen Teil der Algen. Offenbar braucht der Oszillator eine stabile mRNA, aber keine mRNA Synthese. Actinomycin, welches die mRNA Synthese hemmt, hatte keinen Effekt auf die Phase. Nur die Amplitude des Rhythmus wurde verringert (Sweeney et al. (1967), Vanden Driessche (1970)).

#### 5.4 Mehrere Oszillatoren?

Sind die verschiedenen circadianen Schwingungen bei Acelabularia alle von einer Uhr kontrolliert? Die Chloroplastenbewegung, elektrische Potentiale und Sauerstoffproduktion wurden an einer Zelle gleichzeitig gemessen (Schweiger et al. (1983)). Sie blieben immer in gleicher Phase zueinander, auch wenn die Temperatur des Wassers geändert wurde. Entweder werden die verschiedenen Rhythmen also von einer Uhr getrieben, oder es sind verschiedene Oszillatoren, die aber miteinander stark gekoppelt sind. Für letzteres spricht eine Beobachtung von Schweiger and et al. (1986): Die circadiane Chloroplastenwanderung und die circadiane Änderung des elektrischen Potentials werden durch einen 8 stündigen Dunkelpuls im Dauerlicht normalerweise (phasenabhängig) gemeinsam in der Phase verschoben. Gelegentlich kommt es aber vor, dass nur der eine Rhythmus sich verschiebt, der andere nicht. Das würde dafür sprechen, dass zwei verschiedene Uhren die beiden gemessenen Vorgänge kontrollieren.

## 5.5 Interagieren Zellen miteinander?

Es wurde geprüft, ob Acetabularia-Zellen miteinander interagieren (Mergenhagen and Schweiger (1974)). 50 Zellen, die in einem bestimmten 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel gehalten wurden, kamen in ein Gefäß mit einer einzelnen Acetabularia, die um 12 Stunden Phasen-verschoben gehalten worden war (also Licht hatte, wenn die 50 Zellen im Dunkeln waren). Unter Konstantbedingungen beeinflussten diese Zellen die Einzelzelle nicht (A13 (n.d.)). Sie behielt ihren vorher eingestellten Rhythmus unverändert bei (7 Tage gemessen). Auch Euglena und Gonyaulax beeinflussen sich nicht gegenseitig.

## Kapitel 6

# Cyanobakterien -Tagesrhythmen bei Prokaryonten

Erst kürzlich wurde entdeckt, dass Prokaryonten circadiane Rhythmen besitzen. Sie äußern sich bei der Photosynthese, der Stickstofffixierung, der Kohlehydratsynthese, der Zellteilung. Ein Luciferase-exprimierendes Reportergen wurde eingefügt, *so*dass mit Hilfe der Lumineszenz die circadiane Uhr erkannt werden kann. Zahlreiche Mutanten wurden gefunden, bei denen der circadiane Rhythmus geändert ist oder fehlt. Gene wurden identifiziert, die am Uhrwerk beteiligt sind. Mit ihnen konnte der Mechanismus der Uhr untersucht und ein Modell aufgestellt werden. Solche Mutanten wurden auch benutzt, um die adaptive Bedeutung circadianer Rhythmen zu prüfen.

Wenn wir den Mechanismus circadianer Kontrollsysteme untersuchen und schließlich auch verstehen wollen, ist es vorteilhaft, möglichst einfache Systeme zu verwenden. Es soll natürlich ein circadianes Uhrwerk besitzen, aber nicht kompliziert sein, sozusagen ein 'Minimalsystem'. Das ist bei allen Untersuchungen an Organismen eine gute Strategie. Wenn wir zum Beispiel an bestimmten Aspekten der Glykolyse interessiert sind, würden Hefezellen sich als ein geeignetes Minimalsystem anbieten. Sie wurden auch tatsächlich sehr intensiv für solche Studien untersucht. Ein Minimalsystem sollte eine einfache Struktur und Physiologie besitzen. Es sollte leicht zu kultivieren sein und keine Schwierigkeiten machen, damit zu experimentieren. Ferner sollte es möglichst auch genetischen und molekularbiologischen Methoden zugänglich sein. Schließlich sollten die Zeiger der Uhr leicht zu registrieren sein.

Menschliche Blutzellen wurden als ein solches Minimalsystem vorgeschlagen. Sie sind auf den Transport von Sauerstoff von den Lungen in das Gewebe des Körpers spezialisiert. Wie alle Erythrocyten der Säuger besitzen sie im reifen Zustand keine Kerne und keine Nukleinsäuren. Sie enthalten auch keine anderen Organellen, die sich normalerweise in Zellen finden wie Mitochondrien, und können deshalb auch keine Atmung durchführen. Sie sind allein auf ihre Hauptaufgabe zugeschnitten: Sauerstoff an Hämoglobin zu binden und es über den gesamten Körper zu verteilen. Außerdem können Erythrocyten in vitro gehalten werden und lassen sich daher leicht im Labor untersuchen. Es gibt keine Schwierigkeiten, sie unter konstanten Bedingungen bei der gleichen Temperatur und anderen Bedingungen zu halten. Und das Wichtigste: Es wurde angegeben, dass verschiedene Enzyme circadian in ihrer Aktivität schwanken (Ashkenazi et al. (1975)). Diese Arbeitsgruppe fand Änderungen der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, der sauren Phosphatase und der Acetylcholinesterase. Leider waren verschiedene Anstrengungen, diese wichtigen Befunde nachzuprüfen, bisher ohne Erfolg (A14 (n.d.)).

Ein anderes Minimalsystem mit circadianen Änderungen sind Samen von Bohnenpflanzen. Trockene Samen besitzen eine extrem niedrige Atmung, keinen Nukleinsäurestoffwechsel und keine Nukleinsäuresynthese. Trotzdem soll die Atmung circadiane Änderungen zeigen (Bryant (1972)).

Das gemeinsame dieser beiden Systeme ist das völlige Fehlen eines Nukleinsäurestoffwechsels. Das ist wichtig, weil mehrere der kürzlich vorgeschlagenen Modelle circadianer Systeme ein Rückkopplungssystem transkriptionaler und translationaler Ereignisse annimmt (siehe Kapitel 6, Unterabschnitt 14.2.5, Abschnitt 16.8). Es wäre daher von höchstem Interesse, diese Versuche sehr sorgfältig zu wiederholen und dabei Fallen zu vermeiden, die zu falschen Interpretationen führen könnten.

Ein vor kurzem gefundenes und verwendetes Minimalsystem sind bestimmte *Cyanobacteria*. Für eine lange Zeit wurde angenommen, dass es circadiane Rhythmen nur bei Organismen mit einem echten Zellkern gibt, so genannte Eukaryonten. Prokaryonten sollten keine circadianen Uhren haben.

Es war daher eine große Überraschung, als in den achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass circadiane Rhythmen auch bei *Cyanobacteria* existierten. Sie wurden erst an *Oscillatoria* nachgewiesen (Abbildung 6.1 und Stal and Krumbein (1985)) und intensiv an *Synechococcus-* (Grobbelaar et al. (1986), Mitsuno and Sibaoka (1989)) und Synechocystis-Arten untersucht. Dass die Photosynthese der Cyanobakterien nur im Licht ablaufen kann, ist selbstverständlich. Aber auch unter konstanten Dauerlichtbedingungen wird bei Synechococcus in der Photosynthese unterschiedlich viel Sauerstoff gebildet: Ein circadianer Rhythmus mit einer Periodenlänge von 20 Stunden ist dafür verantwortlich (Mitsuno and Sibaoka (1989)). Die Stickstoff-Fixierung, Kohlenhydrat-Synthese und Photosynthese, aber auch die Zellteilung und andere Prozesse stehen unter circadianer Kontrolle (Abbildung 6.3).



Abbildung 6.1: Die Nitrogenaseaktivität einer Oscillatoria spec. (Stamm 23) wurde für acht Tage im Dauerlicht bestimmt, wobei die Acetylenreduktion gemessen wurde. Es zeigt sich ein circadianer Rhythmus. Nach Stal and Krumbein (1985). D079/oscillatoria-cr

Der Befund, dass circadiane Rhythmen bei *Cyanobacteria* vorkommen, weist darauf hin, dass wahrscheinlich circadiane Uhren sehr viel früher entstanden, als bisher angenommen wurde. Cyanobakterien wurden bereits im Flint in Kanada fossil nachgewiesen. Sie sind demnach mehr als 3.5 Milliarden Jahre alt. Es ist nicht bekannt, ob diese bereits circadiane Rhythmen besaßen. Sie waren aber in der Lage Stickstoff aus der Luft zu fixieren (wie Heterozysten in Fossilien belegen, spezialisierte Zellen der *Cyanobacteria* für die Luftstickstoff-Fixierung). Viel später in der Erdgeschichte, nämlich vor 420 Millionen Jahren, lassen sich Tagesrhythmen in den Epitheken von Korallen und den Schalen von Nautiloiden nachweisen (siehe Kapitel 17).

Cyanobakterien sind besonders geeignet für circadiane Untersuchungen. Der Regulationsmechanismus der Transkription ist bei Prokaryonten besser bekannt als bei Eukaryonten. Molekularbiologische Arbeiten an *Cyanobacteria* werden in vielen Labors und intensiv verwendet. Sie haben ein kleineres Genom und sind deshalb günstiger für saturierende Mutagenese von Genen, die für die Funktion der circadianen Uhr nötig sind. Außerdem ist inzwischen das Genom der ersten Cyanobakterien vollständig sequenziert worden (Kaneko and et al. (1996)) und es werden wohl bald mehr dazu kommen.

Wir werden zunächst die wichtigsten Unterschiede zwischen Prokaryonten und Eukaryonten kennen lernen. Danach werden einige circadian gesteuerte Vorgänge bei Cyanobakterien vorgestellt. Neue molekulargenetische Untersuchungen geben Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen (Kondo and Ishiura (1994), Johnson et al. (1996), Golden et al. (1997)): Bei einer Synechococcus- und Synechocystis-Art wurde ein künstlicher Zeiger der circadianen Uhr eingefügt. Er erlaubt, bei vielen Populationen gleichzeitig den Gang der circadianen Uhr zu verfolgen. Außerdem konnten zahlreiche Mutationen im circadianen System hergestellt werden.

## 6.1 Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryonten

In der Tabelle 6.1 sind die wichtigsten Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryonten zusammengestellt (?, fehlt). Neben der Größe sind das vor allem: Bei Eukaryonten wird Transkription und Proteinsynthese durch eine Kernhülle getrennt, während Prokaryonten keinen Kern besitzen. Durch ein Cytoskelett ist bei Eukaryonten Cytoplasmaströmung und damit intrazellulärer Transport möglich. Bei Prokaryonten ohne Kern/Cytoplasma-Trennung würde die Struktur zerstört werden, wenn das Cytoplasma strömen würde. Das Cytoplasma der Prokaryonten enthält DNA, RNA, Proteine und kleine Moleküle, aber keine inneren Strukturen. Durch mehrfache Replikons ist die Teilungskontrolle bei Eukaryonten anders als bei Prokaryonten. Eukaryonten besitzen eine Exozytose, Golgiapparate, endoplasmatisches Retikulum, Zellkompartimentierung mit Mitochondrien, Plastiden und anderen Organellen. Sie haben nicht kodierende DNA, repetitive DNA, und viel mehr und häufiger Splicing der RNA. Das Genom der Prokaryonten ist kleiner, die Zellen sind kleiner, der Teilungsmodus anders. Es gibt nur ein ringförmiges Chromosom. Zellteilung kann unter optimalen Bedingungen alle 20 Minuten stattfinden (dann würden in 11 Stunden 5 Milliarden Zellen gebildet werden, so viel wie es Menschen auf der Erde gibt). Dadurch können sich Prokaryonten schnell an sich ändernde Umweltbedingungen anpassen. Bakterien sind die am weitesten verbreiteten Zellen der Erde.

Cyanobakterien besitzen einen Photosyntheseapparat, der dem der Eukaryonten entspricht. Durch die Pigmente Phycobilicyanin und Phycobilierythrin können sie aber auch Licht zur Photosynthese verwenden, das von Eukaryonten nicht absorbiert werden kann.

Die Prokaryonten bieten somit eine Reihe von Vorteilen für Untersuchungen circadianer Rhythmen: Die Transkriptions- und Translationsregelung ist einfacher, das Genom kleiner, der Bau der Zellen und der Stoffwechsel wesentlich unkomplizierter.

Eukaryonten	Einzeller, Pilze, Pflanzen, Tiere	5-500 µm Länge	aerob	Kern, Mitochondrien, Chloroplasten,	endoplasmatisches Retikulum usw.	sehr lang, linear, viele nichtkodierende	Regionen, Kernmembran	RNA in Kern synthetisiert und	prozessiert, Proteine in Cytoplasma	Cytoskelett aus Proteinfilamenten,	Cytoplasmaströmung, Exocytose	Chromsomen gehen durch	Spindelapparat auseinander	hauptsächlich vielzellig,	Differenzierung in viele Zelltypen
Prokaryonten	Bakterien und Cyanobakterien	$1-10 \ \mu m Länge$	anaerob, aerob	wenige oder keine		ringförmig im Cytoplasma		im gleichen Kompartiment	${ m synthetisiert}$	kein Cytoskelett, keine	Endo- und Exocytose	Chromosomen gehen durch Anheften	an Plasmamembran auseinander	hauptsächlich einzellig	
	Organismen	Zellgröße	Stoffwechsel	Organellen		DNA		RNA und Proteine		Cytoplasma		Zellteilung		Zellorganisation	

Tabelle 6.1: Die wichtigsten Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryonten.

Cyanobakterien - Tagesrhythmen bei Prokaryonten

#### 6.2 Circadiane Rhythmen

Werfen wir einen Blick auf ein Beispiel diurnaler Rhythmen der Beweglichkeit von Prokaryonten. Wasserproben wurden während eines Sommertages von 6 Uhr Uhr morgens ab von der Oberfläche des Mendota-Sees und aus verschiedenen Tiefen bis zu 8 Meter unter der Oberfläche genommen. Alle 3 Stunden wurden bis 21 Uhr weitere Proben gezogen. Unterm Mikroskop wurde die Zahl der Aphanizomenon flos aquae, einem Cyanobakterium, für jede Probe bestimmt und das Profil als Funktion der Zeit aufgetragen. Die Ergebnisse sind im oberen Teil der Abbildung 6.2 wiedergegeben. Die höchste Dichte verschiebt sich im Laufe des Tages, und während der Nacht finden sich nur wenige Zellen an der Oberfläche. Die meisten Zellen waren zu tieferen Schichten des Sees abgesunken, wie die Verschiebung der Maxima zeigt. Die untere Kurve der Abbildung stellt dar, wie sich die vertikale Verteilung an der Oberfläche ändert. Sie schwankt tagesperiodisch.

Eine ganze Reihe von Mechanismen sind bei Cyanobakterien tagesperiodisch gesteuert. So gibt es diurnale Beweglichkeitsrhythmen bei verschiedenen Prokaryonten (Abbildung 6.2). Wie viele andere planktontische Cyanobakterien besitzt auch Anabaena flos aquae Gasvakuolen (Rijn and Shilo (1985)). Sie ändern die Dichte und führen im Sommer und Herbst zur Wasserblüte. Auch Oszillatoria-Populationen zeigen eine diurnale Vertikalwanderung (Foy and Smith (1980)).

Die Sauerstoffproduktion während der Photosynthese von *Synechococcus* erfolgt rhythmisch. Das ist im Licht-Dunkel-Wechsel zu erwarten, wird aber auch unter Dauerlicht beobachtet. Es handelt sich also um einen circadianen Rhythmus (Abbildung 6.3).

Zahlreiche Cyanobakterien können Luftstickstoff fixieren. Sie spielen eine wichtige Rolle



Abbildung 6.2: Beispiele für diurnale Beweglichkeitsrhythmen bei Prokaryonten. Nach Konopka and et al. (1987). D081/motilitprocaryotes

im Stickstoff-Zyklus zwischen Wasser/Boden, Pflanzen, Tieren und der Atmosphäre. Die dafür verantwortliche Nitrogenase wird jedoch vom Sauerstoff gehemmt. Deshalb sorgt bei Synechococcus eine circadiane Uhr dafür, dass dieses Enzym zu Zeiten aktiv ist, zu denen kein Sauerstoff gebildet wird, also normalerweise zur Dunkelperiode des Tages. Andere Zeiger der circadianen Uhr dieser Cyanobakterie sind Kohlenhydratsynthese und Zellteilung (Mitsui et al. (1986) und Abbildung 6.4). Viele Cyanobacteria können sich unter optimalen Bedingungen schneller als 24 Stunden teilen. Das gilt auch für Synechococcus. Trotzdem laufen andere Rhythmen weiterhin circadian ab (zum Beispiel Kondo et al. (1997), Mori et al. (1996)).

Diese Rhythmen gibt es nicht nur bei Synechococcus. Photosynthese, Kohlehydratbildung und Stickstoff-Fixierung verlaufen auch bei Cyanothece circadian (Schneegurt et al. (1997)). Auch das faden-förmige Cyanobacterium Trichodesmium fixiert Stickstoff diurnal und circadian Chen et al. (1996).

Ein weiterer Zeiger der circadianen Uhr kann leicht mit einem pH-Meter registriert werden.



Abbildung 6.3: Sauerstoffabgabe durch die Photosynthese (a) und Stickstoff-Fixierung durch die Nitrogenase (b) bei *Synechococcus* unter 12:12h Licht-Dunkel-Bedingungen (LD) und unter konstantem Licht (LL). Die Nitrogenase-Aktivität ist hoch, wenn die Photosynthese gering ist. Nach Mitsui et al. (1986) D082M/synechococcus-cr



Abbildung 6.4: Kohlenhydratsynthese (Glukose-Äquivalente pro ml und Stunde, rote Kurve) und Zellteilungsrate (Zahl der sich teilenden Zellen, blaue Kurve) von *Synechococcus* verlaufen circadian. Nach Mitsui et al. (1986) D083M/cr-synecho



Abbildung 6.5: Der pH des Mediums wird von *Synechococcus* circadian moduliert. Die pH Werte wurden Trend-korrigiert und die Differenzen aufgetragen. Dauerlicht nach 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel. Nach Kippert, unveröffentlicht. D084/ph-rhythmus-cyanos

Der Rhythmus lässt sich aber nur mit besonderer mathematischer Behandlung heraus kitzeln: Das Medium wird von *Synechococcus* circadian angesäuert (Kippert (n.d.), Abbildung 6.5). Das geschieht stufenweise, wobei die Stufen etwa 24 Stunden Abstand voneinander haben. Die Ansäuerung könnte auf der Aktivität von Protonenpumpen oder auf anderen Protonentransportmechanismen beruhen.

Transportvorgänge werden auch durch eine circadiane Uhr bei der Aufnahme von verschiedenen Aminosäuren durch *Synechococcus* beeinflusst (Chen et al. (1991)).

Alle diese verschiedenen Schwingungen besitzen bereits die typischen Eigenschaften der circadianen Rhythmen der Eukaryonten: Sie laufen unter konstanten Bedingungen frei, sie sind durch Zeitgeber synchronisierbar, und sie sind Temperatur-kompensiert.

## 6.3 Luciferase-exprimierende Synechococcus

Könnte man einen guten Zeiger für die circadiane Uhr finden, wären *Cyanobacteria* wie *Syn*- echococcus oder Synechocystis fast ideale Organismen, um nach Mutanten im circadianen System zu suchen. Die bisher bekannten circadianen Zeiger (voriger Abschnitt) von Synechococcus waren jedoch ungeeignet. Deshalb wurde ein eleganter Trick angewendet, der schon bei anderen Organismen zum Aufklären der circadianen Uhr verwendet wurde: Hinter einen von der circadianen Uhr kontrollierten Promotor wurde ein Reporter-Gen gehängt, das für bakterielle Luciferase kodiert. Auf diese Weise erhielt man tagesperiodisch leuchtende Cyanobakterien (Kondo et al. (1993)).

Benutzt wurde die wt-Synechococcus spec. PCC 7042, die molekulargenetisch gut untersucht ist. Das Synechococcus-Genom hat  $2.6 * 10^6$  Basenpaare und ist kleiner als das von Escherichia coli. Der Promotor P psb AI reguliert das Gen psb AI, welches für das Protein D1 kodiert. D1 bildet mit D2 ein Dimer, an das QB bindet. Es ist wesentlich am Elektronentransport im Photosystem II beteiligt (Abbildung 6.6).

Das Luciferase-Strukturgen luxAB stammt von dem Leuchtbakterium *Vibrio harveyi*. Mit ihm wurde ein Reporter-Plasmid hergestellt und an



Abbildung 6.7: Reporter Vektor pAM977 als Konstrukt des luxA/luxB Luciferase-Strukturgens an einem Promotor PpsbAI des Photosyntheseapparates von *Synechococcus*. Nach Kondo et al. (1993). E086/luciferase-cyanos



Abbildung 6.6: Elektronentransport im Photosynthese-System von Cyanobakterien. Elektronen werden nach Wasserhydrolyse über mehrere Stufen auf  $Q_b$  übertragen.  $D_1$  und  $D_2$ bilden ein Dimer. Es bindet an  $Q_b$ . Das Gen AI kodiert für das Protein  $D_1$  und steht unter Kontrolle des Promotors P psb AI. Dieser wird von der circadianen Uhr beeinflusst. Nach Kondo et al. (1993). E085/ps-cyanos

den Promotor P psb AI an einer 'neutral site' durch homologe Rekombination eingefügt (Abbildung 6.7).

Als Substrat für die Luciferase diente n-Dekanal, ein Aldehyd. Wie erhofft, wurde ein rhythmisches Leuchten der Flüssigkulturen beobachtet. An nicht-transformierten Synechococcus-Zellen wurde zu unterschiedlichen Phasen mRNA extrahiert und nachgewiesen, dass psb AI unter konstanten Dauerlicht-Bedingungen in einem circadianen Rhythmus exprimiert wird (Abbildung 6.8). Der Lumineszenz-Rhythmus wird also durch circadiane Kontrolle des psb-Promotors hervorgebracht (Kondo et al. (1993)). Zwei gegeneinander um 12 Stunden phasenverschobene Kulturen behielten auch unter konstanten Lichtbedingungen die Phasenverschiebung des Lumineszenzrhythmus bei (Abbildung 6.9). Der Rhythmus ist also tatsächlich endogen und nicht durch einen äußeren Zeitgeber bedingt (der vielleicht trotz Dauerlicht vorhanden war). Auch im Dauerdunkel wurde dieser Rhythmus nachgewiesen (Aoki et al. (1997)).

Mit Dunkelpulsen lässt sich der circadiane Rhythmus unter Dauerlicht-Bedingungen phasenverschieben (Abbildung 6.11).

Inzwischen wurde auch bei einem Synechocys-



Abbildung 6.9: Zwei Kulturen von Synechococcus wurden in gegenläufigen 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechseln bei 30<sup>0</sup>C so angezogen, dass die eine Kultur (rot) invers zur anderen Kultur (blau) belichtet wurde. Deshalb kam sie 12 Stunden früher in das Dauerlicht (obere Zeitachse). Die Biolumineszenz schwankt in den Kulturen um 12 Stunden Phasen-verschoben. Auch unter konstanten Lichtbedingungen bleibt die Phasenverschiebung des Lumineszenzrhythmus erhalten. Nach Kondo et al. (1993). D088/delta-phi-cyanos



Abbildung 6.8: Zu unterschiedlichen Zeiten wurde mRNA des psbAI aus *Synechococcus* extrahiert und die Menge bestimmt. Die mRNA wird unter Dauerlichtbedingungen (nach vorausgegangenem 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel) circadian exprimiert. Nach Kondo et al. (1993). D087/mrna-cyanos

tis-Stamm PCC6803 ein Luciferase-Gen eingefügt und ein circadianer Rhythmus des Leuchtens nachgewiesen. Er verläuft auch im Dauerdunkel circadian. Normalerweise würde der Rhythmus im Dunkeln rasch ausdämpfen, aber wenn dem Substrat Glukose zugegeben wird, hält er für mindestens 7 Tage an (?). Mit Lichtpulsen wird der Rhythmus in Kulturen im Dauerdunkel verschoben (Abbildung 6.10, Aoki et al. (1997)). Mit geeigneten Mutanten kann damit der Transduktionsweg des Lichtes verfolgt werden, auf dem schließlich Phase und Amplitude der Uhr beeinflusst werden. Das Genom von Synechocystis wurde inzwischen vollständig sequenziert (Aoki et al. (1997)). Es besitzt verschiedene Moleküle, die für die Transduktion des Lichtes in Frage kommen: Photorezeptoren (zum Beispiel ein Phytochrom), ein Zwei-Komponenten-System, das ein Signal weiterleitet und Adenylatcyclase. Werden bestimmte Gene ausgeschaltet oder überexprimiert, lässt sich feststellen, ob die von diesen Genen kodierten Moleküle am Transduktionsweg des Lichtes beteiligt sind. Bei unter-



Abbildung 6.10: Lichtpulse verschieben den circadianen Rhythmus der Biolumineszenz von *Synechocystis* im Dauerdunkel je nach dem Zeitpunkt der Applikation unterschiedlich stark. Nach Aoki et al. (1997). D088A/cyanosprc-licht

schiedlichen Umgebungstemperaturen ist die Periodenlänge des circadianen Oszillators von Synechococcus fast gleich (Sweeney and Borgese (1989), Kondo et al. (1993)). Die circadiane Uhr dieses Cyanobakteriums ist also Temperatur-kompensiert (Abbildung 6.12). Der  $Q_{10}$ -Wert liegt bei 1.1 und damit in einem Bereich, der für Tagesrhythmen von Eukaryonten charakteristisch ist.

#### 6.4 Mutanten finden

Um Uhr-Mutanten zu finden, muss zweierlei getan werden: Mutationen müssen induziert werden, indem die Cyanobakterien mit einer muta-



Abbildung 6.13: Circadianer Rhythmus der Biolumineszenz transgener *Synechococcus* Cyanobakterien ('Wildtyp', grüne Kurve) und von Mutanten mit unterschiedlichen Periodenlängen (von 16 bis 60 Stunden Länge; rote Kurven kürzere, blaue Kurven längere Perioden als Wildtyp). Nach Kondo et al. (1994). D091/mut-synech





Abbildung 6.11: Phasenverschiebung des Biolumineszenzrhythmus von Synechococcus durch Dunkelpulse. Drei Kulturen wurden im 12:12 stündigen LD-Zyklus gehalten und zur Zeit 0 in Dauerlicht übertragen. Ein einzelner vierstündiger Dunkelpulse wurde 30 (Mitte) beziehungsweise 34 Stunden (unten) nach Beginn des Dauerlichtes gegeben. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wird dadurch die Phase verschoben (blaue Pfeile). Nach Kondo et al. (1993). E089/delta-phi-synech

Abbildung 6.12: Leuchtrhythmus transgener Synechococcus Kulturen im Dauerlicht (nach 12:12 stündigem Licht-Dunkel-Wechsel) bei unterschiedlichen Temperaturen des Seewassers (obere Kurve:  $25^0$  C, mittlere Kurve:  $30^0$ C, untere Kurve:  $36^0$ C). Die zugehörigen Periodenlängen (25.5, 24.0 und 23.0 Stunden) unterscheiden sich nur wenig. Der Biolumineszenz-Rhythmus ist demnach Temperatur-kompensiert. Nach Kondo et al. (1993). D090/tau-t-synech

genen Substanz behandelt und Kolonien vieler behandelter Einzelzellen auf Agarplatten angezogen werden. Zweitens muss der circadiane Rhythmus gemessen werden. Dazu wurde die Biolumineszenz mit einer empfindlichen Videokamera alle 30 Minuten gemessen und für die Kolonien getrennt ausgewertet (Kondo and Ishiura (1994)). Die meisten Klone zeigten keine Änderungen in den Eigenschaften ihrer circadianen Uhr. Aber einige hatten unterschiedliche Periodenlängen oder Amplituden des tagesrhythmischen Leuchtens (Abbildung 6.13).

Die Interpretation dieses Ergebnisses ist aber nicht immer einfach. Um ein Beispiel zu geben: Eine Mutante wurde gefunden, deren Periode nur 22 Stunden betrug, während sie beim Wildtyp 24 Stunden war. Sie wurde sp22 genannt. Diese Mutante kann aber nicht durch das Wildtyp-Gen komplementiert werden und damit wieder die Periodenlänge des Wildtyps erlangen. Bei ihr ist nämlich ein Gen pex mutiert, das im Wildtyp die Periode verlängert (Katsuna (1998)). Das pex Gen ist für normales Wachstum nicht nötig. Auch für die circadiane Oszillation ist es nicht essentiell, denn Amplitude und Form des Rhythmus sind in der pex Mutante normal. Wie die Periode durch pex verlängert wird, ist bisher unbekannt. Auch die Struktur des Genproduktes PEX ist bisher noch nicht aufgeklärt. Die Expression des kaiABC Gens (siehe später) wird durch die pex-Mutation verstärkt. PEX scheint also die Expression des kaiABC Gens zu unterdrücken. Als Resultat scheint das pex Gen die circadiane Uhr irgendwie zu modifizieren. Gleichzeitig wird seine Expression durch die circadiane Uhr modifiziert.

## 6.5 Das Uhrwerk des circadianen Systems

Wie funktioniert die circadiane Uhr dieser Prokaryonten? Drei Dinge erleichterten es, herauszubekommen, wie das Uhrwerk funktioniert: Die einfache Methode, den circadianen Rhythmus zu registrieren, die Uhr-Mutanten, die man erhalten hatte, und molekulargenetische Techniken. Die Wege sind sehr vielfältig und interessant, und viel Arbeit wird hier zur Zeit geleistet. Es würde aber zu viel Zeit und Platz kosten, sie darzustellen. Ich beschränke mich deshalb in diesem Abschnitt darauf, von einigen Ergebnisse dieser Untersuchungen zu berichten.

Wie wollen mit einem kürzlich vorgeschlagenen Modell beginnen (Abbildung 6.14).

Das Uhrwerk ist ein Rückkopplungssystem, in dem die Produkte von drei kai-Genen<sup>1</sup> kaiA,kaiB und kaiC die Transkription ihrer eigenen Gene beeinflussen (Ishiura et al. (1998)). Die verschiedenen kai Produkte interagieren miteinander in einer Weise, die noch nicht ganz verstanden ist. Sie hemmen auch (KaiA-Produkt) oder fördern (KaiC) den kaiBC-Promotor<sup>2</sup>. Ein Uhren-Ausgangs-Faktor beeinflusst den kaiA Promotor. Zusätzlich werden Gene kontrolliert ('clock controlled genes'), die wiederum ihre Produkte circadian exprimieren (Ishiura et al. (1998)).

Eine Reihe von Experimenten zeigte, dass die circadiane Kontrolle der Genexpression für bestimmte Gene spezifisch sein kann. Diese besitzen spezifische cis-Elemente und transwirkende Faktoren. In der Regel scheint die circadiane Kontrolle der Genexpression jedoch global zu sein. Wird das luxAB Gen an andere bekannte regulatorische Regionen gehängt,

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>kai bedeutet im Japanischen Rhythmus

 $<sup>^2 {\</sup>rm kaiB}$  und kaiC werden beide durch den kaiB-Promotor kontrolliert



Abbildung 6.14: Rückkopplungsmodell des circadianen Oszillators von Cyanobacteria. Drei Gene kaiA, kaiB und kaiC exprimieren rhythmisch mRNA und diese produzieren die Proteine KaiA, kaiB und KaiC. Sie interagieren miteinander (Kasten). KaiA hemmt den Promotor  $P_{kaiA}$ . KaiC fördert den kaiBC-Promotor. Zeitverzögerung und Rückkopplung bilden eine circadiane Uhr, die über Ausgänge Uhr-kontrollierte Gene beeinflusst. Deren Produkte werden damit circadian schwanken. Nach Ishiura et al. (1998). E092A

zeigen diese ebenfalls einen circadianen Rhythmus, wenn auch mit schwächerer Amplitude. Mit besonderen Methoden wurde ferner das luxAB Gen an alle möglichen Promotoren gehängt. War die Insertion erfolgreich, ergab sich eine circadiane Biolumineszenz unabhängig vom jeweiligen Promotor (Liu et al. (1996), Golden et al. (1997)). Etwa 80% dieser Klone leuchteten am subjektiven Abend<sup>3</sup> maximal. Einige Klone zeigten maximales Leuchten zu anderen Phasen, manche davon auch am subjektiven Morgen. Offenbar gibt es eine globale circadiane Kontrolle der Genaktivität, daneben aber auch individuelle Kontrolle spezifischer Gene mit anderen Phasenlagen (Abbildung 6.15). Es wurde vorgeschlagen, dass die Kontrolle der Transkription mit einem Gen-unspezifischen generellen Mechanismus funktioniert wie zum Beispiel 'supercoiling' der DNA, Energieladung (siehe Seite 366) oder RNA-Polymerase-Aktivität. Wenn es keine anderen Kontrollebenen gibt, würde dadurch das betreffende Gen zeitlich gesteuert.

Es wurde auch diskutiert, warum bei eukaryontischen Organismen nur relativ wenig circadiane Steuerung gefunden wurde (Golden et al. (1997)). Das könnte damit zusammenhängen, wie der circadiane Rhythmus entdeckt wird. Bei den bisher untersuchten Eukaryonten wird eine mRNA nur dann als zu einem 'clock controlled gen' gehörend identifiziert, wenn sie zu verschiedenen Zeiten des Zyklus stark variiert. Die bei den Cyanobakterien angewendete Methode dagegen reflektiert direkt die Aktivität der Promotoren. Die Uhr ist demnach möglicherweise viel globaler, als ursprünglich angenommen wurde, aber nicht alle Vorgänge in der Zelle oszillieren circadian.

Da *Cyanobacteria* sich so stark von Eukaryonten unterscheiden, fragt sich, ob der circadia-



cyano-modell | E092 | 21.10.2001

Abbildung 6.15: Modell der circadianen Gen-Expression von *Synechococcus*. Der circadiane Oszillator wird durch Zeitgeber wie den Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert. Ein Ausgang dieses Oszillators beeinflusst die Transkription global (normale Phase und Amplitude). Trans-Faktoren können zusätzlich die Amplitude und Phasenlage des Rhythmus modifizieren. Nach A15 (n.d.). E092/cyano-model

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>das heißt zu Zeiten, wo in einem Licht-Dunkel-Wechsel das Licht ausgehen würde; hier sind die Kulturen aber in konstanten Bedingungen

ne Rhythmus der beiden Gruppen auf dem gleichen Mechanismus beruht. Nach der Endosymbiontenhypothese entstanden Chloroplasten aus Cyanobacteria. Wenn auf diese Weise circadiane Uhren übertragen wurden, sollten die circadianen Systeme der Pflanzen und Cyanobacteria sich mehr ähneln als denen der Pilze und Tiere. Wenn die Funktionen der beteiligten Gene besser bekannt sind, kann diese Frage vielleicht beantwortet werden. Nach dem jetzigen Stand ist es eher unwahrscheinlich, dass ihre circadianen Rhythmen sich aus einem gemeinsamen ursprünglichen Mechanismus entwickelten. Es ist eher so, dass sie zu verschiedenen Zeiten der Evolution mehrmals erfunden wurden.

### 6.6 Eingänge zur Uhr

Wie sieht es mit den Eingängen in die circadiane Uhr aus? Circadiane Uhren müssen mit den tagesperiodischen Umweltfaktoren durch Zeitgeber synchronisiert werden. Wir erwarten, dass tägliche Licht-Dunkel-Wechsel, aber auch Temperatur-Wechsel und vielleicht auch andere 24-Stunden-Rhythmen der Umwelt synchronisieren können. Licht-Dunkel-Zyklen und Temperatur-Zyklen synchronisieren tatsächlich die Synechococcus-Uhr. Allerdings sind die Zeitgeber der circadianen Rhythmen von Cyanobakterien noch wenig untersucht. Bei Cyanotheke wird der circadiane Rhythmus angestoßen, wenn das Medium einer stationären Kultur verdünnt wird (Schneegurt et al. (1997)). Die Sensoren sind noch nicht bekannt. Rotes und blaues Licht sind für die Synchronisation am wirksamsten. Bei Synechocystis ist der Photorezeptor dem Phytochrom homolog (Kaneko and et al. (1996)).

#### 6.7 Ausgänge

Circadiane Uhren kontrollieren verschiedene Vorgänge auf transkriptionaler, translationaler, biochemischer und physiologischer Ebene. Bei Cyanobakterien wurden bereits einige dieser Vorgänge erwähnt. Andere sind bekannt, viele noch zu entdecken. So wäre es interessant, Bewegungen von Cyanobakterien auf einen circadianen Rhythmus hin zu untersuchen. Vertikalbewegungen, die bei manchen Cyanobakterien mit Hilfe von Gasvakuolen erfolgen, wurden bereits erwähnt. Es würde sich lohnen, sie auf eine circadiane Modulation dieser Bewegungen hin zu untersuchen.

Gene, die nicht Teil der circadianen Uhr sind, aber von dieser kontrolliert werden, sind zum Beispiel rpoD2. Es kodiert einen sigma 70 Transkriptionsfaktor<sup>4</sup>. RpoD2 scheint ein Faktor zu sein, der die Amplitude der circadianen Schwingung mancher Gene erhöht (Tsinoremas et al. (1996)).

Bei mehr als zehn Polypeptiden von Synechococcus RF-1 ist bisher eine circadiane Regulation nachgewiesen (Huang and Pen (1994)). Sicherlich werden bald weitere Komponenten der Ausgänge der circadianen Uhr bekannt werden. Allerdings ist diese Regulation kompliziert und noch nicht gut verstanden. Das globale Regulator-Gen ntcA, das für ein DNA Bindeprotein NtcA kodiert, ist ein transkriptionaler Aktivator von Genen, die unter circadianer Kontrolle stehen und mit der Stickstoffassimilation zu tun haben (Bradley and Reddy (1997)).

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Transkriptionsfaktoren werden von 'Schaltergenen ´ gemacht und beeinflussen die Transkription anderer Gene, zum Beispiel solchen, die am Uhr-Mechanismus beteiligt sind.

## 6.8 Adaptive Bedeutung der circadianen Rhythmen von Cyanobakterien

Was ist die adaptive Bedeutung einer circadianen Uhr bei Cyanobakterien? Bei Stickstofffixierenden Cyanobakterien sorgt sie dafür, dass Photosynthese und Stickstoff-Fixierung zu unterschiedlichen Zeiten ablaufen. Das ist wichtig, da Sauerstoff, der bei der Photosynthese entsteht, die Nitrogenase als Schlüsselenzym der Stickstoff-Fixierung hemmt. Allerdings scheint diese zeitliche Trennung nicht in allen Fällen unbedingt nötig zu sein (Ortega (1991), Roenneberg and et al. (1993)). Diazotrophe können also ganz verschiedene Mechanismen benutzen, um die Nitrogenase vor Sauerstoff zu schützen (siehe Gallon (1981) und Gallon (1993)).

Eine wichtige Funktion der circadianen Uhr der Cyanobakterien ist wahrscheinlich 'Warnen vor Licht'. Der photosynthetische Apparat der Cyanobakterien ist besonders empfindlich auf Licht-Schäden. Deshalb ist hier ein Schutz durch Vorgänge, die durch die circadiane Uhr gesteuert werden, vorteilhaft.

Es wurde gezeigt, dass Mutanten mit kürzerer Periodenlänge als der Wildtyp (dessen Periode bei etwa 25 Stunden liegt), in einem 25-Stunden-Tag (12.5 Stunden Licht, 12.5 Stunden Dunkelheit) schnell von letzterem verdrängt werden, während in einem 22 Stunden-Tag die Mutante den Wildtyp verdrängt (siehe Johnson et al. (1998a) und auch Seite 407).

## Kapitel 7

# Rhythmen der CAM-Pflanzen

Als Anpassung an trockenes Klima erlaubt der Crassulaceen-Säure-Stoffwechsel Pflanzen, ihre Stomata während der heißesten Zeit des Tages geschlossen zu halten und CO<sub>2</sub> während der Nacht aufzunehmen. Das reduziert Wasserverluste erheblich. Circadiane Rhythmen sind an der Kontrolle von Schlüsselenzymen dieser Stoffwechsel-Besonderheit beteiligt. Die Bedeutung, Biochemie und Regulation des CAM Rhythmus und Registriermethoden werden dargestellt. Wie Licht den Rhythmus synchronisiert und welche Photorezeptoren beteiligt sind, ist ein weiteres Thema. Schließlich wird ein Modell erklärt, welches die biochemischen Mechanismen und ihre circadiane Kontrolle erklärt.

Die Blätter von Bryophyllum calycinum, die allgemein einen krautigen Geschmack haben, sind am Morgen sauer wie Sauerampfer, wenn nicht noch mehr; im Verlauf des Tages verlieren sie die Säure, werden gegen Mittag geschmacklos und bitter gegen Abend. Heyne 1815

CAM Stoffwechsel ist bei zahlreichen Pflanzen verbreitet. Sie gehören zu 33 Familien, wie zum Beispiel die Cactaceae, Crassulaceae, Euphorbiaceae, Aizoaceae (Mesembryanthemum), Bromeliaceae, Asclepiadaceae, Orchidaceae, Liliaceae, Agavaceae, Asteraceae, Vitaceae und Geraniaceae. Ohne Orchideen haben wahrscheinlich 9000 Arten CAM; es wird geschätzt, dass dazu noch 7000 Orchideenarten kommen, die ebenfalls CAM-Stoffwechsel besitzen. Diese 16000 Arten machen 6% der Gefäßpflanzen aus. Wahrscheinlich ist dieser besondere biochemische Weg polyphyletisch entstanden, da er in so vielen Familien vorkommt. CAM kommt auch in Nicht-Sukkulenten vor, beispielsweise in Tillandsia. Bei dieser Mesophyll-Sukkulenz ist nur der photosynthetisierende Teil betroffen. Auch die Wasserpflanze Isoetes (Lycopodiopsida) besitzt einen CAM-Stoffwechsel.

Der CAM Stoffwechsel hat seinen Namen (*Crassulacean Acid Metabolism*) von den Dickblattgewächsen, den Crassulaceen. Sie kommen in ariden Gebieten vor und besitzen sukkulente Blätter und Stämme (Abbildung 7.1). In diesen kann Wasser in Wassergewebe (Epidermis, Subepidermis, zum Beispiel bei *Peperomia*) oder im Parenchym (Mesophyll der Blätter oder Cortex im Stamm) gespeichert werden. Die Oberfläche ist reduziert. Das hilft den Pflanzen, trockene Bedingungen zu überleben. Dazu kommt ferner, dass die Pflanzen ihre Spaltöffnungen erst in der Nacht öffnen und am Tage geschlossen halten (Livingston (1907)).  $CO_2$ , unabdingbar für die Photosynthese, wird



Abbildung 7.1: Kaktus als Beispiel einer CAM-Pflanze aus der Sonora-Wüste in Arizona. E093/cam-plant

nachts aufgenommen und als organische Säure (Malat) zwischen-gelagert (CO<sub>2</sub>-Speicher). Im Gegensatz zu C4-Pflanzen, bei denen die CO<sub>2</sub>-fixierenden Zellen *räumlich* getrennt sind, ist bei den CAM-Pflanzen CO<sub>2</sub>-Fixierung und -Assimilation *zeitlich* getrennt. Am Tage wird es in CO<sub>2</sub> und Oxalessigsäure zerlegt. Die Kohlensäure kann dann für die Photosynthese verwendete werden.

Es gibt eine Reihe von Büchern und Übersichtsartikeln zur Biochemie, Physiologie und Ökologie des CAM-Stoffwechsels (Kluge and Ting (1978), Osmond (1978), Ting and Gibbs (1982), Lüttge (1987), Ting (1985), Winter and Smith (1996)).

Der CAM-Stoffwechsel ist circadian gesteuert und soll deshalb hier besprochen werden. Für neuere Übersichten siehe Wilkins (1992), Winter and Smith (1996), Carter and et al. (1996).

## 7.1 Beispiele, Eigenschaften und Bedeutung des CAM

Während C3-Pflanzen 0.5 bis 1 Liter Wasser brauchen, um 1g Zucker zu produzieren, sind das bei CAM-Pflanzen nur 0.5 bis 0.6 Liter bei guter, 0.18-0.5 bei weniger guter und 0 bei schlechter Wasserversorgung. Dafür ist ihr Wachstum langsamer. C4-Pflanzen brauchen 0.25 bis 0.35 Liter, wachsen aber schneller als CAM-Pflanzen.

CAM-Pflanzen haben in ihrem photosynthetisch aktiven Gewebe große Interzellularräume. Dadurch wird der Gasaustausch erleichtert. CAM Zellen sind groß, haben eine dünne Wand, ein dünnes peripheres Cytoplasma, relativ wenig Chloroplasten. Diese sind mit und ohne Grana und oft Stärke-reich. Die Vakuolen der Chlorophyll-haltigen Zellen sind groß und speichern unter anderem Malat.

CAM Pflanzen haben weniger Stomata als andere Pflanzen. Bei Kalanchoe sind auf der oberen Blattseite 3200 pro  $cm^2$ , auf der unteren Blattseite 4700. Der Öffnungs- und Schließmechanismus der Stomata von CAM-Pflanzen ist wie bei anderen Pflanzen. Osmotisch wirksame Substanzen akkumulieren unter Energieverbrauch, der Turgor erhöht sich und Wasser wird aufgenommen, die Schließzellen dehnen sich aus, die Stomata öffnen sich. Stomata sind jedoch nicht für den CAM-Stoffwechsel nötig. Bei der Wasserpflanze Isoetes (Lycopodiopsida) fehlen Stomata; trotzdem zeigen diese Pflanzen einen CAM-Stoffwechsel. Er wird hier wie bei anderen Wasserpflanzen durch den niedrigen CO<sub>2</sub>-Gehalt des Wassers am Tage bedingt.

Die Atemhöhle der CAM-Pflanzen ist größer als die anderer Pflanzen. Oft findet sich ein subepidermales Wassergewebe. Die Kutikula der CAM Pflanzen ist wenig Wasser-durchlässig. Das Gewebe von CAM Pflanzen erwärmt sich langsamer und kühlt langsamer ab. Wachstum gibt es noch bei  $0^0$  und  $50^0$  C. Die Hitzeresistenz schwankt circadian.

Der CAM Stoffwechsel ist je nach Pflanzenart fakultativ oder obligat. *Mesembryanthemum crystallinum* ist ein Beispiel für eine fakultative CAM-Pflanze. Sie wird von einer C3-Pflanze zu einer CAM-Pflanze, wenn der Boden viel Salz enthält (200 bis 500 mM) oder trocken ist (Edwards and et al. (1996)). In mediterranen Gebieten keimt die Pflanze im Januar zur Regenzeit. Sie wächst zunächst als C3-Pflanze, um zu Beginn der Trockenzeit im Juli den Stoffwechsel auf CAM umzustellen. Bei anderen Pflanzen wird der CAM-Stoffwechsel photoperiodisch (Kalanchoe blossfeldiana) und/oder thermoperiodisch induziert.

Zur Ökologie, Produktivität und wirtschaftlichen Bedeutung von CAM-Pflanzen siehe (Kluge and Ting (1978), Kluge and Ting (1978), Nobel (1996)).

#### 7.1.1 Bedeutung der Vakuole im CAM Stoffwechsel

CAM Pflanzen haben in der Regel Zellen mit einer großen zentralen Vakuole. Das Zytoplasma nimmt nur 1% des Zellvolumens ein, die Zellwand 2% (Steudle et al. (1980)). Die Vakuolen sind für die osmotischen Vorgänge, Ionenspeicherung und -transport und Regulation des CO<sub>2</sub>-Stoffwechsels wichtig. Der osmotische Druck ist niedrig, zum Teil unter 1 MPa. Das gilt auch für Pflanzen mit hohem Wasserdefizit. Die Zellwände sind dadurch sehr elastisch und können von der Pflanze als Wasserspeicher benutzt werden.<sup>1</sup> Neben Malat ist auch Zitronensäure und Isozitronensäure in den Vakuolen gespeichert. Malat kann als Osmotikum zum 'Wasserernten' benutzt werden (Smith and Lüttge (1985), Smith and Lüttge (1985), Ruess and Eller (1985)). Durch einen pH-statMechanismus wird der pH im Cytoplasma konstant gehalten (Davis (1973)). Ferner wird für ein Gleichgewicht zwischen Anionen und Kationen gesorgt.

#### 7.2 Biochemie des CAM

Bei der  $CO_2$ -Fixierung **im Dunkeln** passiert folgendes:

 $PEP + CO_2 \Rightarrow (PEP - Carboxylase)) \Rightarrow OES \Rightarrow Malat^2$ 

Die Säuren bilden sich je nach Pflanze entweder aus Polysacchariden (Stärke, Glucan: *Kalanchoe daigremontianum*) oder aus wasserlöslichen Hexosen (*Ananas, Clusia*).

 $CO_2$  reagiert wahrscheinlich als  $HCO_3$ . Malat wird nachts aktiv in die Vakuole transportiert und verlässt diese passiv, um am Tage im Cytoplasma während der Photosynthese verbraucht zu werden. Licht (Dunkelrot!) fördert den Ausstrom von Malat aus der Vakuole ins Cytoplasma (Nalborczyk et al. (1975)). Malat wird im Cytoplasma durch Malat-Enzym dekarboxyliert und das freiwerdende  $CO_2$  zur Photosynthese verwendet (Abbildung 7.2).

Folgende Enzyme sind am CAM-Stoffwechsel beteiligt:

• PEPCarboxylase ist ein allosterisches Enzym und sehr aktiv. Es liegt in einer Tagund einer Nachtform vor. <sup>3</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Ein hoher Malatgehalt lässt Wasser in die Vakuole einströmen. Damit würde sich der Turgor ändern. Da aber über den Tonoplasten keine Druckänderungen stattfinden können, ändert sich die Membrandicke  $(1/100 \text{ bar ändert sie bereits um einige Angstrom (Zim$ mermann (1978))). Das wiederum ändert die Membraneigenschaften wie die Permeabilität stark.

 $<sup>^2\</sup>mathrm{Malat}$ kann in andere Säuren wie Aspartat umgewandelt werden

 $<sup>^{3}</sup>$ PEPCarboxylase wird durch das Gen Ppc1 und Ppc2 kodiert (Cushman (1996)).

Die Nachtform ist ein Tetramer, die Tagform ein Dimer.

Die PEPCarboxylase der C3 Pflanzen unterscheidet sich von der der CAM Pflanzen. Letztere hat eine höhere spezifische Aktivität und eine andere Beweglichkeit auf SDS-Gelen



Abbildung 7.2: Schema des CAM-Stoffwechsel einer Zelle. Im Dunkeln (blau) wird  $CO_2$  durch die PEPCarboxylase an PEP angelagert und OES gebildet. Aus diesem entsteht Malat. Es wird in die Vakuole transportiert. Wenn die Konzentration 100 mM erreicht hat oder Licht beginnt, verlässt Malat die Vakuole. Es wird durch Malatenzym zu Pyruvat dekarboxyliert. Das dabei frei werdende  $CO_2$  wird in den Chloroplasten im Verlauf der Photosynthese im Tricarbonsäurezyklus (TCA) zu Stärke oder anderen Polyglucanen umgewandelt. Glucane dienen als Baustoff und sind Ausgang für PEP. Nach Kluge (1972). E094a/CAM-Schema.
- Glukose-6-Phosphat aktiviert die PEP-Carboxylase.
- Malatdehydrogenase MDH wandelt Oxalessigsäure in Malat um, indem NADH<sub>2</sub> zu NAD<sup>+</sup> reduziert wird. MDH wird durch Licht aktiviert.
- Malatenzym dekarboxyliert Malat zu Pyruvat, indem es NADP<sup>+</sup> in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> zu NADPH<sub>2</sub> umwandelt. Es gibt eine 55kDa- und eine 61 kDa Untereinheit und ein Dimer mit niedriger, ein Tetramer mit hoher Affinität für Malat.
- PEPkinase wandelt Oxalessigsäure in PEP und CO<sub>2</sub> um, wobei ATP sich in ADP verändert. Bei hoher Malatenzym-Aktivität ist die PEPkinase gehemmt, und umgekehrt.

PEP wird aus Glukose-Phosphat gebildet. Diese entsteht durch Phosphorylierung der Stärke oder anderer Polyglucane (Abbildung 7.3). Bei hoher CO<sub>2</sub>-Aufnahme wird Malat akkumuliert, bei niedriger abgebaut. Am Ende der Dunkelperiode hat sich Malat in den Vakuolen angehäuft (bis 200 mM) und die Blattzellen sind stark sauer. Mehr als 90% des Malats befindet sich in der Vakuole.

In der **Lichtperiode** fließt Malat aus der Vakuole in das Cytoplasma und wird durch das Malatenzym zu Pyruvat dekarboxyliert. Das  $CO_2$  wird im Licht im Verlauf der Photosynthese assimiliert und Kohlenhydrate synthetisiert. Am Ende der Lichtperiode ist Malat für die Photosynthese abgebaut und die Konzentration beträgt nur noch 30 mM.

#### 7.2.1 Kompartimentierung der CAM Enzyme

Die PEPCarboxylase ist Membran-gebunden, kommt aber nicht in Chloroplasten, Mitochondrien und Mikrobodies vor. MDH findet sich in den Membranen der Mitochondrien und Mikrobodies. Malatenzym ist in den Mitochondrien, im Cytosol und den Chloroplasten. Die Produkte der CO<sub>2</sub>-Dunkelfixierung sind ebenfalls kompartimentiert und von den Mitochondrien, Mikrobodies und Chloroplasten getrennt. Möglicherweise gibt es Isozyme in verschiedenen Kompartimenten.

#### 7.2.2 Regulation des CAM

Der CAM Stoffwechsel ist sowohl durch Umweltbedingungen als auch durch Stoffwechselvorgänge stark reguliert. So greifen von außen die Temperatur, das Licht, der Wassergehalt des Bodens und der Luft ein. CAM wird außerdem photoperiodisch gesteuert (*Kalanchoe blossfeldiana*) (Kluge and Ting (1978)). Im Inneren wirken die Stomata, Enzyme, die Wasserbedingungen und der Stofftransport in die Kompartimente. CO<sub>2</sub>-freie Luft hemmt die Malatsynthese während der Nacht, während CO<sub>2</sub>angereicherte Luft die Malatsynthese fördert.

Während der Dunkelperiode wird Malat in der Vakuole gespeichert. Ist deren Speicherkapazität erschöpft, wird die Malatsynthese durch PEPCarboxylase im Cytoplasma durch den Anstieg der Malatkonzentration im Zytoplasma gehemmt (Substrathemmung). Diese Regulation durch negative Rückkopplung ist im Stoffwechsel weit verbreitet.

Ferner der CAM-Stoffwechsel istauch circadian kontrolliert: Die Malatmenge, PEPCarboxylaseund MDHase-Aktivität schwanken circadian. Es handelt sich dabei um eine circadiane post-translationale Regelung der spezifischen Aktivität der PEPCarboxylase (und nicht um eine circadiane Synthese und/oder Degradation). PEPCarboxylase tritt in einer Tag- und einer Nachtform auf. Die Nachtform ist die aktive, die Tagform ist inaktiv: Sie ist zehn mal empfindlicher



Abbildung 7.3: Phosphoenol-Pyruvat Bildung aus Glukan über Glukosephosphate, Fruktosephosphate, Glycerinaldehyd und Glycerinsäure. Nach Sutton (1974). E095n/pep-cam

auf Malat-Hemmung ( $K_i$  Malat 0.3mM) als die Nachtform ( $K_i$  3.0mM). Die spezifische Aktivität unter  $V_{max}$  ist jedoch konstant. Durch Phosphorylierung eines Serinrestes geht die Tagform der PEPCarboxylase in die Nachtform über. Dephosphorylierung führt zur Tagform (Nimmo et al. (1987), Nimmo et al. (1986)). Dadurch wird verhindert, dass Malat am Tage 'im Leerlauf' durch Malatenzym dekarboxyliert wird. Die Umwandlungen geschehen bereits 1-2 Stunden vor Lichtbeginn und 4-6 Stunden nach Dunkelbeginn. Auch im Dauerlicht findet diese Umwandlung statt. Sie wird also circadian gesteuert.

Die PEPCarboxylase wird durch eine PEPC-Kinase phosphoryliert und durch eine PEPC-Phosphatase dephosphoryliert. Es wurde nachgewiesen, dass Synthese und Abbau der PEPC-Kinase für den CO<sub>2</sub>-Rhythmus der CAM Pflanzen verantwortlich ist (Wilkins (1992) und Abbildung 7.4).

#### 7.3 Registrieren

 $CO_2$  wird in der Regel mit einem Ultrarot-Absorptionsschreiber (URAS) gemessen (Abbildung 7.5). Die Temperatur wird in den Messküvetten konstant gehalten und Wasser aus der Luft entfernt, da es wie  $CO_2$  infrarotes Licht absorbiert und das Messergebnis verfälschen würde.

Neuere Methoden benutzen den  $O_2/CO_2$ -Austausch, wobei die Isotope <sup>18</sup>O und <sup>13</sup>C massenspektrometrisch bestimmt werden. Auch <sup>14</sup>C-Markierungen können zum Registrieren benutzt werden. Ferner lässt sich die Leitfähigkeit der Blätter registrieren. Sie schwankt mit dem Malatgehalt circadian.



PEPCkinase-rh | D096 | 18.4.2002

Abbildung 7.4: Bedeutung der PEPC-Kinase bei CAM-Pflanzen für die Phosphorylierung der PEPC und den CO<sub>2</sub>-Rhythmus. In der Dunkelperiode wird die Tagform der PEPC ( $PEPC_D$ ) durch eine Phosphatase in die Nachtform ( $PEPC_N$ ) umgewandelt. Dabei spielen der pH und die Malatkonzentration eine Rolle. Glukose-6-Phosphat fördert ebenfalls diesen Vorgang. Die Phosphatase zeigt keinen Tagesrhythmus ihrer Aktivität. Die Nachtform ist unempfindlicher auf die Hemmung durch Malat als die Tagform. In der Lichtperiode wird durch eine Kinase die Tagform der PEPC ( $PEPC_D$ ) gebildet. Die Kinase wird tagesperiodisch beeinflusst. Die Tagform wird durch Malat stark gehemmt, Glukose-6-Phosphat aktiviert die Tagform nicht. Nach Carter et al. (1991), Wu and Wedding (1985) und Nimmo et al. (1986). E096/PEPCkinaserh



Abbildung 7.5: Messung des  $CO_2$  von CAM-Pflanzen mit einem Ultrarot-Absorptionsschreiber (URAS). Die Pflanze befindet sich in einer Küvette mit konstanter Temperatur und Luftfeuchte. Ein Lichtkasten erlaubt kontrollierte Beleuchtung zu verschiedenen Zeiten. Von der Pflanze wird ein Luftstrom in einer Kältefalle von Wasser befreit und durch einen URAS geleitet. Je nach dem  $CO_2$ -Gehalt wird unterschiedlich viel Infrarot-Licht absorbiert. Parallel dazu wird auch der  $CO_2$ -Gehalt der Kontroll-Luft gemessen und aus beiden Werten der  $CO_2$ -Gehalt der Pflanzen-Luft ermittelt und registriert. Mit Rotametern kann der Luftstrom reguliert werden. Nach Kluge (1972). E097v/uras

# 7.4 CAM Rhythmen im Licht-Dunkel-Wechsel und unter konstanten Bedingungen

In Licht-Dunkel Zyklen reichert sich Malat in der Vakuole während der Dunkelperiode an. Sobald die Lichtperiode beginnt, sinkt der Malatgehalt rasch und stark ab (Abbildung 7.6). Malat wird im Zytoplasma abgebaut und das entstandene  $CO_2$  im Calvin-Zyklus durch Photosynthese zu Kohlenhydraten synthetisiert. Welche Vorgänge dabei ablaufen, wird im folgenden Abschnitt besprochen.



Abbildung 7.6: Änderung des Malatgehalts ( $\mu$ Äquivalente pro g Frischgewicht) im Licht-Dunkel-Wechsel eines Tages bei Kalanchoe tubiflora (nach Sutton (1974)). D094/malateverlauf

Unter konstanten Bedingungen sind sowohl die PEPCarboxylase als auch das Malatenzym circadian rhythmisch (Abbildung 7.4). Sie haben unterschiedliche Phasenbeziehungen (Queiroz (1974)).

Im Dauerdunkel mit  $CO_2$ -freier Luft ist die  $CO_2$ -Abgabe der Atmung circadian, mit niedrigen Werten während der subjektiven Nacht und hohen Werten während des subjektiven Tages (Abbildung 7.8, Wilkins (1992), Wilkins (1960), Queiroz (1974)).



Abbildung 7.7: Die Aktivität der PEPCarboxylase und des Malatenzym verlaufen invers zueinander. PEPCarboxylase ist abends und zu Beginn der Nacht stark aktiv, Malatenzym in der späten Nacht und am Morgen. Enzymaktivität in Einheiten pro 100 mg Frischgewicht. Nach Kluge and Ting (1978). D098m/crpepcase

Der Rhythmus hält nur 2-3 Zyklen an und ist stark gedämpft. Die Periodenlänge des Rhythmus ist zwischen 10 und  $28^{0}$ C relativ unabhängig von der Temperatur ( $Q_{10} = 1.03$ ) (Abbildung 7.8). Sie ist mit höherer Temperatur etwas kürzer. Wird alle 24 Stunden für 15 Minuten ein hellroter Lichtpuls gegeben, dämpft der Rhythmus nicht aus.

Auch die CO<sub>2</sub>-Aufnahme im **Dauerlicht** in normaler Luft verläuft circadian (mit markiertem CO<sub>2</sub> nachgewiesen). Der Rhythmus ist wenig gedämpft und kann je nach Lichtintensität 10 Tage und länger beobachtet werden (Abbildung 7.8). Der Malatgehalt der Vakuole ist niedrig, weil der Tonoplast im Licht für Malat durchlässig ist. Die Temperaturkompensation dieses CO<sub>2</sub>-Rhythmus ist weniger gut als die im Dauerdunkel ( $Q_{10} = 0.8$ ) (Abbildung 7.8). Die Periode steigt von 16 Stunden bei 10<sup>0</sup>C auf 24 Stunden bei 32<sup>0</sup>C.

Die Photosynthese schwankt im Dauerlicht



Abbildung 7.8: Gedämpfter CO<sub>2</sub>-Rhythmus einer CAM-Pflanze im Dauerdunkel bei  $15^{0}$ C, zugeführte Luft ohne CO<sub>2</sub> (obere Kurve links). CO<sub>2</sub>-Abgabe einer CAM-Pflanze im Dauerlicht bei  $xx^{0}$ C, zugeführte Luft mit CO<sub>2</sub> (untere Kurve). Die y-Achse zeigt die abgegebene (obere Kurve) beziehungsweise aufgenommene CO<sub>2</sub>Menge in  $\mu g$  pro g Frischgewicht und Stunde. Nach Wilkins (1960), Wilkins (1969). Geringe Temperaturabhängigkeit der Periodenlänge des CO<sub>2</sub>-Rhythmus im Dauerdunkel und etwas stärkere Temperaturabhängigkeit der Periodenlänge des in der vorigen Abbildung gezeigten O<sub>2</sub>-Rhythmus im Dauerlicht in rechter oberer Kurve illustriert. Nach Anderson and Wilkins (1989) und Wilkins (1962). D098/CO2-DD

nicht rhythmisch. Transpiration, Leitfähigkeit der Stomata und der CO<sub>2</sub>-Partialdruck schwanken hingegen circadian. Die CO<sub>2</sub>-Aufnahme wird durch die Kapazität der Mesophyllzellen für Karboxylierung bestimmt.

Ohne Epidermis verschwindet dieser Rhythmus im Mesophyll. Daraus wird gefolgert, dass er durch circadiane Leitfähigkeitsänderungen der Stomata entsteht.

Unterhalb von  $10^{0}$ C und oberhalb von  $30^{0}$ C oder bei 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft verschwindet der Rhythmus. Das System geht in einen Fixpunkt für tiefe beziehungsweise hohe Temperaturen über, die beide um  $180^{0}$  gegeneinander Phasen-verschoben sind.

Der Rhythmus kann durch Licht- und Temperatur-Pulse Phasen-verschoben werden. Rotlicht wirkt dabei wie weißes Licht, blaues Licht wirkt nicht (Wilkins (1960)).

Auch die **Photorezeptoren** wurden untersucht. Das Phytochromsystem ist für die Lichtperzeption im CAM-Rhythmus zuständig. Es beeinflusst Kanäle und Pumpen, möglicherweise über IP<sub>3</sub>, Proteinkinasen, Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und Turgor (siehe 20.13).

#### 7.5 Modelle

Es wurden Modelle aufgestellt, die den circadianen Rhythmus im CAM-Stoffwechsel erklären können (Lüttge and Beck (1992) und Abbildung 7.9). Sechs Speicher (Zytoplasma, Vakuole, CO<sub>2</sub>-Speicher, Stärke-, Glukose-6-Phosphat und Phosphoenol-Pyruvat-Speicher) sind miteinander durch Flüsse verbunden. Durch Rückkopplungen des Malats im Zytoplasma auf die Malatsynthese, der Malatsynthese auf die Umwandlung der Stärke in Glukose-6-Phosphat und des CO<sub>2</sub> in der Pflanze mit dem CO<sub>2</sub> in der Luft in Verbindung mit einem Hysterese-Schalter für den Malat-Ausstrom aus der Vakuole kommt es zu Oszillationen. Entscheidend ist dabei die Hysterese-Eigenschaft der Tonoplastenmembran (Neff et al. (1998)). Malat strömt aktiv in die Vakuole ein. Bei einem maximalen Malatgehalt der Vakuole ändert sich die Eigenschaft des Tonoplasten. Der aktive Einstrom hört auf, Malat strömt aus der Vakuole aus. Erst, wenn die Malatkonzentration in der Vakuole einen bestimmten unteren Wert  $x_{min}$ erreicht hat, wird wieder Malat aktiv in die Vakuole strömen. Dieser Schalter zwischen aktivem und passivem Malattransport hat also Hysterese-Eigenschaften. Die Verzögerungen im Schalten sind für die Zeitverzögerung verantwortlich, diese wiederum für die lange circadiane Periode. Für Details und neuere Publikationen siehe Blasius et al. (1997) und Blasius et al. (1999).



Abbildung 7.9: a: Sechs Speicher (Kästen Zytoplasma, Vakuole, CO<sub>2</sub>-Speicher, Stärke-, Glukose-6-Phosphat und Phosphoenol-Pyruvat-Speicher) sind miteinander durch Flüsse verbunden (grüne Pfeile). Durch Rückkopplungen des Malats im Zytoplasma (rote Pfeile) auf die Malatsynthese, der Malatsynthese auf die Umwandlung der Stärke in Glukose-6-Phosphat und des CO<sub>2</sub> in der Pflanze mit dem CO<sub>2</sub> in der Luft in Verbindung mit einem Hysterese-Schalter für den Malat-Ausstrom aus der Vakuole kommt es zu Oszillationen. Dabei spielt für die Regulation des Malat-Ein- und Ausstroms zur Vakuole ein Hysterese-Schalter (b) eine wichtige Rolle. Er bewirkt Verzögerungen des Schaltvorganges und damit die langen Perioden des circadianen Rhythmus. Nach Lüttge and Beck (1992). E098c/CAM-Modell

# Kapitel 8

# Blütenuhr Kalanchoe

Die Blüten von Kalanchoe blossfeldiana öffnen sich während des Tages und schließen sich während der Nacht. Wie registriert man diese Vorgänge? Welche Strukturen und Mechanismen sind dafür verantwortlich? Welche Modelle kann man benutzen, um sie zu beschreiben? Darüber wird in Kapitel berichtet. Im folgenden Kapitel sehen wir, wie Blüten und Bienen miteinander interagieren und was Rhythmen dabei für eine Rolle spielen. In einem weiteren Kapitel wird gezeigt, wie Bienen bei der Orientierung einen Sonnenkompass benutzen. Es wird gezeigt, wie er funktioniert und eingesetzt wird

Kalanchoe blossfeldiana kommt endemisch auf Madagaskar vor. Sie gehört zur Familie der Dickblattgewächse (*Crassulaceae*), die wiederum zur Ordnung der *Saxifragales* und der Unterklasse der *Rosidales* gehört. Crassulaceen sind kosmopolitisch. Man findet sie vor allem in warmen, trockenen, felsigen Gebieten mit langen Trockenperioden. Die roten Blüten von *Kalanchoe* sind in Thyrsen (Ebensträußen) angeordnet. Die Samen sind winzig. Die Blütenbildung wird durch Kurztag induziert. Im Langtag bleiben die Pflanzen vegetativ (siehe 13.2.5). Die Blütenblätter von Kalanchoe sind am Tage geöffnet und in der Nacht geschlossen (Abbildung 8.1). Die Bewegung setzt sich unter konstanten Bedingungen schwachen Grünlichts fort. Die Periodenlänge beträgt etwa 22 Stunden. Die Blütenblattbewegung wird also von einer circadianen Uhr gesteuert. Auch abgeschnittene Blüten, die in einer geeigneten Lösung gehalten werden, zeigen noch den circadianen Rhythmus des Öffnens und Schliessens.

# 8.1 Anatomie der Blüten und Mechanismus der Blütenblattbewegung

Die Blüten bestehen aus einem Kelch, einer verwachsenen Blütenröhre, vier Blütenblättern und dem Fruchtknoten mit Narbe und Staubblättern. Die Blütenblätter haben eine obere Epidermis mit papillenartigen Zellen und rot gefärbten Vakuolen (Abbildung 8.1). Die untere Epidermis besteht aus einem Pflasterepithel. Zwischen den Epidermen sind etwa 15 Schichten von Parenchymzellen zu finden. Sie sind für die Bewegung der Blütenblätter verantwortlich und werden deshalb auch als Motorzellen bezeichnet. Ferner gibt es im Zentrum der Blütenblätter Leit- und Stützgewebe in Form eines Zentralstranges.

Das Öffnen und Schließen der Blütenblätter be-



Abbildung 8.1: Blüte von Kalanchoe blossfeldiana mit geschlossenen (links) und geöffneten Blütenblättern (rechts). Ein Querschnitt durch ein Blütenblatt (mittlerer Teil der Abbildung) zeigt papillenförmige obere Epidermiszellen. Sie sind durch Anthocyan in den Vakuolen rot gefärbt. Darunter sind mehrere Schichten von Parenchymzellen, Die untere Epidermis ist ein Pflaster-Epithel (unterer Teil der Abbildung). 099A/099B/anatomie-kal ruht auf Turgoränderungen in den Motorzellen (Abbildung 8.2). Wahrscheinlich laufen die



Abbildung 8.2: Tagesverlauf der Saugkraft in den oberen Epidermiszellen der Blütenblätter (rot) und Blütenblattbewegung (blau) bei Kalanchoe blossfeldiana. Nach Schrempf (1980). D100/turgor-kal

gleichen Vorgänge ab wie bei den Gelenken der Leguminosen. Allerdings sind die anatomischen Bedingungen bei den *Kalanchoe* Blüten einfacher. Es gibt nur eine Bewegungsregion, also keine speziellen Gelenke mit Extensor- und Flexorteil. Die untere Epidermis dient vermutlich als biegbares Widerlager für die sich streckenden oder schrumpfenden Motorzellen im Parenchym. Die obere Epidermis erlaubt durch die Struktur ihrer Papillenzellen, den Längenänderungen des Motorgewebes zu folgen. An ihr wurden rhythmische Turgoränderungen nachgewiesen.

Die physiologischen Grundlagen wurden von Schrempf (1977) untersucht. Die  $K^+$  und  $Na^+$ Konzentrationen in den Blüten ändern sich tagesperiodisch (bei Albizzia und Mimosa ändert sich die  $Na^+$  Konzentration nicht). Ca<sup>2+</sup> dagegen bleibt konstant. Zum Rhythmus der Wasseraufnahme ist der Turgorrhythmus um mehr als 3 Stunden Phasen-verschoben (Lippe (1957)). Die beiden Vorgänge verlaufen also unabhängig voneinander. Das zeigt sich auch darin, dass die einzelnen Zipfel der Blüten unabhängig voneinander reagieren, wenn nur ein Zipfel beleuchtet wird.

# 8.2 Registrieren der Blütenblattbewegung

Verschiedene Methoden wurden verwendet, um die Blütenblattbewegung der Kalanchoe zu registrieren. Früher benutzte man photoelektrische Methoden, bei denen der Schatten der Blüten auf Solarzellen fiel. Je nach dem Öffnungszustand der Blüten waren die elektrischen Signale unterschiedlich groß und konnten mit Spannungsschreibern oder Computern registriert und in Kurvenform dargestellt werden. In letzter Zeit haben sich Bildanalyseverfahren durchgesetzt. Sie sind einfach zu handhaben und man kann eine große Zahl von Blüten gleichzeitig registrieren. Die Daten lassen sich dann direkt auf dem Computer mit einem Zeitreihenprogramm analysieren (Abbildung 8.3).

## 8.3 Wie Licht die Blütenblattbewegung beeinflusst

Im folgenden wird die Wirkung von Dauerlicht, Dauerdunkel und Lichtpulsen auf die *Kalanchoe*-Blütenblattbewegung besprochen.

Im Gegensatz zum Dauerdunkel dämpft Dauerlicht die rhythmische Bewegung der *Kalanchoe*-Blüten. Die Periodenlänge hängt dabei von der Lichtintensität und der Wellenlänge ab (Karve et al. (1961)).

Lichtpulse verschieben den Rhythmus, wenn sie zu verschiedenen Phasen des Zyklus gegeben werden (Abbildung 8.4). Die Phasenresponsekurven gehören je nach der Stärke des Pulses zum schwachen oder starken Typ (Johnsson et al. (1972)). Der äußere Teil des Blütenzipfels ist besonders empfindlich auf phasenverschiebende Lichtpulse, der Basisteil zeigt keine Wirkung. Die Zipfel reagieren unabhängig voneinander auf Lichtpulse.  $9erg/cm^2sec$ roten Lichtes (632nm) haben keinen Effekt,  $90erg/cm^2sec$  wirken phasenverschiebend.



Abbildung 8.4: Phasen-Respons-Kurve der circadianen Blütenblattbewegung von Kalanchoe auf dreistündige Lichtpulse, die zu verschiedenen Zeiten nach Beginn des 'Dauerdunkel' (schwaches Grünlicht) gegeben wurden. Verfrühungen des Rhythmus gegenüber der Kontrolle sind nach oben, Verspätungen nach unten aufgetragen (in Stunden). Nach Johnsson et al. (1972). E102/prc-kal

Aus dem Wirkungsspektrum folgt, dass mindestens zwei Pigmente beteiligt sind, eins mit einem Maximum der Wirkung im roten Spektralbereich zwischen 600 und 650 nm, eins mit einem Maximum im UV-Teil des Spektrums (Schrempf (1975)). Möglicherweise ist Phytochrom (Abbildung 8.5) beteiligt, aber die Wirkung lässt sich nicht mit Dunkelrot revertie-



Abbildung 8.3: Registrieren der Kalanchoe Blütenblattbewegung mit Hilfe eines Bildanalysesystems. Die Blüten werden mit einer Pinzette vom Blütenstand abgebrochen und in Löcher einer Polyurethanscheibe gesteckt. Diese schwimmt auf einer 0.2M Rohrzucker-Lösung. Eine Video-Kamera nimmt in regelmäßigen Abständen Bilder der Blüten im Dauer-Grünlicht auf. Die Bilder werden digitalisiert und mit einem Atari-Computer in einem Programm ausgewertet. Je nach Bedarf kann jede einzelne Blüte oder alle Blüten zusammen in ihrem Bewegungsrhythmus registriert werden. E101/kal-reg

ren (diskutiert von Schrempf (1975)). Ähnliches wurde auch beim Ausrollen der Grasblätter von Virgin (1962) und Deutsch and Deutsch (1974) gefunden. Offenbar gibt es verschiedene physiologisch wirksame  $P_{DR}$ . Eins davon hat Kurzzeiteffekte, ein später gebildetes akkumuliert und führt zu Langzeiteffekten. Phytochrom ist auch bei anderen Pflanzen oft Rezeptor für Lichtwirkungen auf circadiane Rhythmen (siehe Unterabschnitt 20.13). In anderen Fällen sind blau-absorbierende Pigmente dafür zuständig (Beispiel: Coleus, Halaban (1969), jedoch Wilkins (1973)). Phytochrom ist, wie auch andere Pigmente, jedenfalls kein wesentlicher Bestandteil des circadianen Oszillators. Es ist bei Albizzia, Phaseolus und Mimosa im Gelenk lokalisiert. Bei Kalanchoe sind auch Schirmpigmente (Anthocyan) beteiligt. Die Papillen der oberen Epidermis erhöhen die Lichtausbeute (Haberlandt (1905), Mayer et al. (1973), Vogelman (1993)).

#### 8.3.1 Der singuläre Punkt.

Es gibt einen weiteren Lichteffekt auf die Blütenblattbewegung von Kalanchoe. Wenn ein sehr spezieller Lichtpuls zu einer bestimmten Phase gegeben wird, verschwindet der Rhythmus. Mit 120 Minuten hellrotem Licht von  $2300 erq/cm^2 sec \ 0.5$  Stunden vor bis 0.5 Stunden nach dem dritten Minimum gegeben werden viele Blüten arrhythmisch (Abbildung 8.6). Den gleichen Effekt erzielt man mit 60 Minuten UV von  $3600 erg/cm^2 sec$ . Durch einen zweiten Lichtpuls oder Temperaturpuls oder auch durch bestimmte Substanzen, die als Puls gegeben werden, lässt sich die Blütenblattbewegung wieder anstoßen. Andere Substanzen sind wirkungslos. Mit dieser Methode lässt sich feststellen, ob eine Substanz mit den Zustandsvariablen des schwingenden Systems interagiert. Zustandsvariablen sind wichtige Teile des schwingenden Systems, ohne die der Oszillator nicht



Abbildung 8.5: Lichtpulse verschiedener Wellenlängen und Quantendichte wurden Kalanchoe Blüten gegeben, um den Rhythmus der Blütenblattbewegung zu verschieben. Es wurde bestimmt, wie viel Lichtquanten für die verschiedenen Wellenlängen (Abszisse) benötigt werden, um den Rhythmus um 3 Stunden zu verschieben. Schon niedrige Werte genügen im Rot und UV. Auf der Ordinate wurde der reziproke Werte der Photonendichte aufgetragen, damit die Maxima den wirksamen Wellenlängen entsprechen. Das Aktionsspektrum zeigt, dass mindestens zwei verschiedene Pigmente beteiligt sind. Nach Schrempf (1975). E103/phyt-kal



Abbildung 8.6: Arrhythmie durch eine spezielle Behandlung der Kalanchoe-Blüten durch einen Lichtpuls. Wird ein Lichtpuls  $LP_1$  zur Zeit gegeben, in der die Blüten geschlossen sind, und ist Dauer und Intensität des Lichtpulses 'richtig', hören die Blüten auf, sich zu bewegen. Das System ist arrhythmisch. Ein zweiter Lichtpuls  $LP_2$  der gleichen Dauer und Intensität bringt das System wieder zum Schwingen. Nach Engelmann et al. (1978). D104n/ar-kal

funktioniert. Nur wenn eine Substanz mit solch einer Zustandsvariablen interagiert, fangen die arrhythmischen Blüten wieder an zu schwingen (Engelmann et al. (1978), Engelmann (1996)).

8.4 Wirkung von Temperatur

Unterschiedliche, aber konstante Umgebungstemperaturen beeinflussen die Periodenlänge der Kalanchoe-Blütenblattbewegung nur wenig. Nur die Phasenlage wird verändert: Bei hohen Temperaturen kommt das erste Öffnungsmaximum früher als bei niedrigen Temperaturen. Unterhalb von  $13^{0}$ C und oberhalb von  $30^{0}$ C ist der Rhythmus stark gedämpft oder verschwunden (Oltmanns (1960)).

Im Gegensatz zu konstanter Temperatur beeinflussen Temperaturpulse die *Kalanchoe* Uhr in ähnlicher Weise wie Lichtpulse. Phasenresponsekurven wurden sowohl für Hitzepulse als auch für Kältepulse erstellt (Abbildung 8.7 und Engelmann et al. (1974)). Pulse mit erhöhter Temperatur wirken wie Lichtpulse. Temperatur beeinflusst auch die Zeit, die ein Lichtsignal braucht, um zum Oszillator zu gelangen (Engelmann and Heilemann (1981)).

#### 8.5 Wirkung von Substanzen

Kalanchoe-Blüten eignen sich gut dazu, die Wirkung verschiedener Substanzen auf die rhythmische Bewegung der Blütenblätter zu testen, da sie abgeschnitten in Lösungen gesteckt werden können.

In Wasser ist die Schwingung gedämpft. Wird das Wasser mit Zucker versehen, ist die Dämpfung geringer. Von Saccharose, Glukose und Laktose dämpft Glukose am wenigsten. Für Versuche mit isolierten Blüten ist eine Konzentration von 0.2 M Glukose optimal. Die Verstärkung der Schwingung durch Zucker geht über den Stoffwechsel und nicht über ihre Turgor-Wirkung, wie Versuche mit einem Laktose-Analogon zeigen (Engelmann and



Abbildung 8.7: Phasenresponsekurve der Blütenblattbewegung von Kalanchoe auf dreistündige  $40^{\circ}C$  Hitzepulse, die zu verschiedenen Zeiten nach Beginn des 'Dauerdunkel' (schwaches Grünlicht) gegeben wurden. Verfrühungen des Rhythmus gegenüber der Kontrolle sind nach oben, Verspätungen nach unten aufgetragen (in Stunden). Nach Engelmann et al. (1974). D105n/prc-t-kal

Vielhaben (1965)). Turgor-beeinflussende Substanzen (Polyethylenglycol) haben keinen Effekt auf den circadianen Oszillator (Engelmann and Böhm (1974)).

Schweres Wasser ( $D_2O$ ) verlangsamt die Schwingung Konzentrations- abhängig von 23 auf 26 Stunden (Kontrolle versus 70%  $D_2O$ ). 4stündige  $D_2O$ -Pulse verschieben je nach dem Zeitpunkt der Applikation den Rhythmus bis zu 1.5 Stunden (Maurer and Engelmann (1974)).

Ionen wie  $K^+$  und  $Na^+$  haben bis zu einer Konzentration von 0.5M keine Wirkung auf die Blütenblattbewegung (Steinheil (1969)). Li<sup>+</sup> verlängert die Periode Konzentrations-abhängig. Ab 5 mM ist es toxisch (Engelmann (1973)). Ähnlich wie bei Albizzia beeinflussen Ionencarrier wie Nonactin und Valinomycin den Rhythmus nicht. Wenn K<sup>+</sup>-Änderungen für die Turgorunterschiede im circadianen Rhythmus verantwortlich sind, sollten eigentlich Ionophore den Rhythmus stark beeinflussen. Bei Gonayulax und Phaseolus ist das auch der Fall. Vielleicht gelangen bei Kalanchoe die Substanzen nicht in das Bewegungsgewebe? Oder die Temperatur war zu niedrig gewählt: Valinomycin wirkt erst bei höheren Temperaturen.

Tetraethylammoniumchlorid, ein  $K^+$ -Kanal-Hemmstoff, bewirkt als dreistündiger Puls gegeben Phasen-Verzögerungen der Blütenblattbewegung bis zu 3 Stunden. Dauergabe dämpft den Rhythmus, die Periode wird aber nicht beeinflusst (Dorka (1991)).

Auch Vanadat, ein Plasmalemma-ATPase Hemmstoff, verzögert als Puls gegeben den circadianen Rhythmus, hat aber keinen Effekt auf die Periode, wenn es dauernd angeboten wird. Arrhythmische Blüten werden durch einen Vanadat-Puls nicht zum Schwingen gebracht. Protonenpumpen sind demnach kein essentieller Bestandteil des Oszillators (Eckhardt and Engelmann (1984)). Alkohole beeinflussen die Periodenlänge (Kastenmeier et al. (1977)).

#### 8.6 Wirkung von Hormonen

Wie Pflanzenhormone auf circadiane Rhythmen wirken, wurde von Koukkari and Warde (n.d.) referiert. Abscissinsäure wird bei Pflanzen bei Wassermangel gebildet und als Stresshormon verwendet. Deshalb wurde geprüft, ob es auch auf die circadiane Uhr wirkt. Zwar konnte durch einmalige ABA-Gaben der Rhythmus in Abhängigkeit von der Phase des Rhythmus verschoben werden, aber die Periodenlänge wurde nicht beeinflusst (Abbildung 8.8). Das Hormon beeinflusste die Uhr also nicht direkt (Schrempf (1980)). Jasmonat ist ein weiteres Hormon, welches unter Stress gebildet wird. Im Gegensatz zu ABA verkürzt es die Periode der Blütenblattbewegung, beeinflusst also die Uhr direkt (Abbildung 8.9). Es kann jedoch nicht arrhythmische Blüten wieder zum Schwingen bringen. Es scheint also nicht mit Zustandsvariablen, sondern nur mit der Geschwindigkeit des Oszillators zu interagieren. Außerdem öffnet Methyljasmonat die Blüten dauernd, wenn es für längere Zeit angeboten wird. Es ist bekannt, dass Methyljasmonat Kartoffelknollen und andere Knollen zum Schwellen bringt. Möglicherweise ist Methyljasmonat mit Metaplasin identisch, eine Substanz, die für die Sukkulenz der Kalanchoe-Blätter im Kurztag verantwortlich sein soll (Harder and Witsch (1940)).

## 8.7 Modell der Kalanchoe Blütenuhr

Ein Rückkopplungsmodell von Johnsson und Karlsson wurde verwendet, um die rhythmische



Abbildung 8.8: Phasenresponsekurve durch vierstündige ABA-Pulse  $(10^{-5}M)$  bei der *Kalanchoe*-Blütenblattbewegung (unten): Nur Verzögerungen des Rhythmus gegenüber der Kontrolle beobachtet (negative Werte). Die Zeit-gleich eingetragene Blütenblattbewegung von Kontrollen zeigt die obere Kurve. Stunden im schwachen Grünlicht nach 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel. Nach Schrempf (1980). D106/prc-aba-kal



Abbildung 8.9: 0.05  $\mu l$  Methyljasmonat (Struktur rechts unten) wurde zur Zeit, die mit einem senkrechten Pfeil markiert ist (untere Kurve), zugegeben. Es verkürzt die Periode der rhythmischen Kalanchoe-Blütenblattbewegung von 21.8 Stunden (Kontrolle, obere Kurve) auf 19.8 Stunden. Nach Engelmann et al. (1997). D107/jasmonat-kal



Abbildung 8.10: Ein Rückkopplungsmodell von Johnsson und Karlsson wurde auf die Kalanchoe Blütenuhr angewendet. Ein Sollwert  $c_{ref}$  wird mit einem Ist-Wert c(t) verglichen. Falls die Werte voneinander abweichen, wird das Fehlersignal  $c_{ref} - c(t)$  durch eine nichtlineare Funktion f verstärkt, in einer Gewichtsfunktion H gewichtet, indem vorausgegangene Werte mit unterschiedlicher Stärke den jetzigen Wert beeinflussen, und nach Integration als neuer Ist-Wert wieder mit dem Referenzwert verglichen. Die Größe c(t) schwankt periodisch, wenn die Funktionen passende Parameter erhalten. Nach Johnsson and Karlsson (1972). E108v/rkm-kal

Blütenblattbewegung von Kalanchoe zu simulieren. Ursprünglich wurde damit die gravitrope Pendelbewegung beschrieben (siehe Seite 23). Es lässt sich aber auch für eine Reihe anderer rhythmischer Vorgänge erfolgreich verwenden. Im Fall der Kalanchoe-Uhr konnte die Phasen-verschiebende Wirkung von Lichtpulsen und Temperaturpulsen gut simuliert werden (Johnsson et al. (1973)). Sogar die Induktion von Arrhythmie durch eine spezielle Belichtung war voraussagbar (Abbildung 8.10).

# Kapitel 9

# Blüte und Insekt

Die Blüten dienen den Pflanzen zur Fortpflanzung und Verbreitung. Viele Pflanzen locken mit ihnen Insekten, Vögel oder Fledermäuse an. Die Blütenbesucher bestäuben die Pflanzen, und diese haben zahlreiche Methoden entwickelt, um Selbstbefruchtung zu verhindern und Fremdbefruchtung zu verstärken. Zu den Werbemitteln gehören nicht nur Farben, Formen, Düfte und das Anbieten von Nektar- und Pollen. Auch die zeitliche Koordination mit den Aktivitäten der Befruchter ist wichtig und deshalb weit verbreitet. In diesem Kapitel werden rhythmische Vorgänge vorgestellt, die die Interaktion von Insekten und Blüten verbessern. Es wird zunächst gezeigt, dass Fremdbefruchtung für Pflanzen vorteilhaft ist. Viele Blüten öffnen sich je nach Art der Pflanze zu bestimmten Tages- oder Nachtzeiten, und Insekten wie zum Beispiel Bienen benutzen diese Zeit zu Besuchen. Verschiedene Methoden werden von Pflanzen benutzt, um Insekten anzulocken. Sie geben zum Beispiel Düfte ab, die besonders in der Nacht bestäubende Insekten anziehen. Oft steht die Emission unter tagesperiodischer Kontrolle. Am Beispiel der Blattschneiderbiene Megachile rotundata wird auf die wirtschaftliche Bedeutung hingewiesen.

### 9.1 Vorteil der Fremdbestäubung

Während der Evolution der Organismen hat es sich als Vorteil erwiesen, Selbstbefruchtung zu vermeiden und stattdessen Fremdbefruchtung zu erreichen. Dadurch wird die Rekombination von Genen erhöht. Aus diesem Grunde gibt es viele Mechanismen, die Selbstbefruchtung unterbinden.

So ist es auch bei Blütenpflanzen. Fremdbestäubung (Xenogamie) ist weit verbreitet. Für Selbstbestäubung (Autogamie) und Nachbarbestäubung (Geitogamie) gibt es wirksame Sperrmechanismen. Neben abiotischer Bestäubung (Wind, Wasser) spielt dabei die biotische Bestäubung eine große Rolle: Der Blütenstaub wird von Tieren übertragen. Die Pflanzen bieten Nahrung, Schutz und Unterkunft an. Sie werben dafür durch Blütenfarbe, Düfte und besondere Blütenformen. Wie in der Werbung der Wirtschaft wird auch hier manchmal Betrug eingesetzt.

Besonders häufig findet man als Bestäuber Insekten. Sie werden vor allem durch den Pollen und den Nektar als Nahrungsquelle angelockt. Zum Teil bieten die Blüten aber auch Schutz und Wärme. Bei manchen Orchideenblüten wird der Sexualtrieb bestimmter Insektenmännchen angesprochen. Schließlich können Blüten auch Brutplätze darstellen. Die Symbiose der Yuccamotte und der Yuccapflanze sind dafür ein interessantes Beispiel.

Die Blüten haben sich im Laufe der Evolution an bestimmte Insektengruppen als Bestäuber angepasst. So gibt es ausgesprochene Schmetterlings- und Bienenblumen. Und parallel dazu haben sich auch die Insekten an die Blüten angepasst. Wahrnehmung, Erinnerung und Zeitsinn sind dabei wichtig. Darauf wird im Folgenden etwas näher eingegangen.

Die Filme von Baumann (Herr der Blüten, Blühender Heiratsschwindel) geben dafür einen schönen Einstieg. Siehe dazu auch (Hess (1990), Dobat (1985)).

## 9.2 Blumenuhr und Zeitsinn der Bienen

Linne hat 1747 eine Blumenuhr aufgestellt. Sie gibt wieder, wann sich bestimmte Blüten öffnen und schließen. Auch andere Rhythmen gibt es bei Blüten: Pollen- und Nektarangebot, Duftabgabe, Wärmeproduktion. Es ist also vorteilhaft für Insekten, diese Öffnungszeiten der Blüten im Kopf zu haben, um Energie zu sparen und zum günstigsten Zeitpunkt mit dem Sammeln zu beginnen. Ferner ist es für sie auch gut, Blüten der gleichen Art zu besuchen. Sie lernen die Besonderheiten der Blüten kennen und einzusetzen, um schnell und effektiv an Pollen und Honig zu kommen. Blumenstetigkeit in Verbindung mit einem Zeitsinn sind besonders bei Bienen entwickelt.

Bienen lassen sich leicht auf Futter dressieren. Das hatte Forel (1910) beim Frühstücken auf der Veranda seines Ferienhauses beobachtet. Bienen kamen schon kurz *vor* dem Auftragen der Marmelade zum Tisch geflogen, um sich zu bedienen. Als die Familie bei schlechterem Wetter im Haus aß, kamen trotzdem Bienen zur erwarteten Futterquelle. Forell schloss daraus auf einen Zeitsinn, der den Bienen bei ihrer Nahrungssuche zur Hilfe kommt.

Später hat von Frisch und seine Schüler/innen mit Bienen zahlreiche Dressurversuche durchgeführt (Frisch (1965)). Danach sind als Signale für Nahrung wichtig: Duft, Farbe, Zeit und Blütenform (in dieser Reihenfolge). Düfte sind bereits bei einem Lernanflug erfolgreich, Farben bei 3 bis 4, Dressurzeiten bei 6 bis 10 und Blütenformen bei 30 bis 40. Duftgemische sind charakteristisch für Blüten und Düfte können im Stock weitervermittelt werden. Deshalb spielen sie eine so große Rolle. Die Erinnerung an den Duft verschwindet nach einiger Zeit, kommt aber nach 24 Stunden wieder zur Geltung. Auch unter Konstantbedingungen ist das zu beobachten.

Weil Pollen und Nektar und die damit verbundenen Signale von den Blüten oft nur zu bestimmten Zeiten dargeboten werden, haben Bienen besondere Sammelzeiten.

# 9.3 Tagesperiodisches Öffnen von Blüten

Verschiedene Pflanzen öffnen ihre Blüten zu ganz bestimmten Tageszeiten. Sie werden befruchtet und verwelken, wenn die Frucht sich entwickelt. Das lässt sich zum Beispiel an *Pharbitis* (Trichterwinde) gut beobachten: Sie blühen morgens auf (der englische Name 'morning glory' deutet darauf hin) und verwelken am Abend (Winfree (1976)). Linne hat 1751 eine Blumenuhr konstruiert, in der verschiedene Pflanzen so im Kreis angeordnet sind, dass sie ihre Blüten zu den entsprechenden Tages- und Nachtzeiten öffnen oder schließen



Abbildung 9.1: Linné schlug eine Blumenuhr vor, die in dieser Abbildung illustriert wird. Dargestellt in Boer (n.d.). 109/blumenuhr

(Abbildung 9.1). Aus Amerika hat sich in Europa die Nachtkerze *Oenothera biennis* (*Onagraceae*) eingebürgert. Sie blüht von Juni bis Ende Oktober. Die fertig entwickelten Blüten öffnen sich am Abend zwischen 20 Uhr und 22 Uhr Uhr sehr rasch. Es ist faszinierend, diesen Vorgang zu beobachten. Da jeden Tag neu entwickelte Blüten hinzukommen, kann man über mehrere Monate hinweg das Öffnen verfolgen. Auch im Dauerlicht wird dieser Rhythmus beibehalten. Er ist also endogen (Arnold (1959)).

Andere Pflanzen öffnen und schließen ihre Blüten über mehrere Tage hinweg zu bestimmten Zeiten. Dazu gehört zum Beispiel das feurige Käthchen *Kalanchoe*, über die im vorausgegangenen Kapitel eingehender berichtet wurde.

#### 9.4 Andere Beispiele zum Sichern der Befruchtung

Bei Parnassia palustris wird jeden Tag eins der fünf Staubblätter auf die Spitze des Fruchtknotens geschoben, der Staubbeutel öffnet sich nach oben und der Pollen kann durch Fliegen verbreitet werden. Am nächsten Tag wird der Staubbeutel am Außenrand abgeworfen und eine neue Anthere schiebt sich zur Spitze. Erst nachdem alle Staubbeutel abgeworfen sind, öffnet sich die Narbe (Abbildung 9.2). Pollen kann



. aanacsaaraanansak tahuu oon (uu)

Abbildung 9.2: Das erste Staubblatt hat sich nach links außen bewegt. Das zweite Staubblatt hat sich von hinten über die geschlossene Narbe gelegt. Jeden Tag wird eins der fünf Staubblätter sich zur Seite bewegen und ein neues sich über die Narbe legen. Erst nachdem alle Staubbeutel abgeworfen sind, öffnet sich die Narbe und kann (fremd)befruchtet werden. Nach Hess (1990). 110/parnassia

von manchen Pflanzen den Befruchtern nur zu bestimmten Tageszeiten zur Verfügung gestellt werden (Bünning (1967)).

Bei anderen Pflanzen schwankt die Produktion und Zusammensetzung des Nektars tagesperiodisch (Pesti (1976)). Wird die Nektarabgabe auf bestimmte Tageszeiten beschränkt, können sich nahe verwandte Arten phänologisch isolieren. In den Urwäldern Trinidads wird Anguria, ein Kürbisgewächs, durch den Falter *Heliconius* befruchtet. Die Nektarabgabe von *A. umbro*sa erfolgt zwischen 7 und 12 Uhr, die von *An*guria triphylla von 12 bis 19 Uhr (Abbildung 9.3). Auch Düfte werden oft nur zu bestimmte



Abbildung 9.3: Die Nektarabgabe von Anguria umbrosa erfolgt zwischen 7 und 12 Uhr (grün), die Pollenabgabe (links unten) davor. Bei Anguria triphylla wird der Nektar zwischen 12 und 19 Uhr abgegeben (rot), der Pollen (unten Mitte) zwischen 10 und 12 Uhr. Nach Hess (1990). D111N/anguria

Tageszeiten abgegeben. Ihre Bestäuber, Insekten, Vögel und Fledermäuse, benutzen ihre eigenen Uhren und Orientierungsmechanismen, um sich dem tagesperiodischen Verhalten der Blüten anzupassen.

#### 9.5 Duftrhythmen

Wie sich die Intensität des Blütenduftes von Pflanzen tagesperiodisch ändert, ist bisher nicht besonders intensiv untersucht. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Duftabgabe durch einen endogenen Rhythmus gesteuert wird. Die Blüten von *Cestrum nocturnum* duften nachts und sind am Tage geruchlos (Overland (1960)). Es wurde im 'headspace' mit gaschromatografischen Methoden festgestellt, wie sich die Intensität dieses Duftes und die von Hoya carnosa ändert (Altenburger and Matile (1988), Altenburger and Matile (1990)). Während bei Hoya carnosa die Duftstoffe synchron abgegeben werden, sind bei Stephanotis floribunda die Maxima der Duftstoffe 1-Nitro-2-Phenylethan und Methylbenzoat um 12 Stunden gegeneinander verschoben (Matile and Altenburger (1988) und Abbildung 9.4). Dadurch ändert sich die Zusammensetzung des Duftes drastisch. Einige Tabakarten werden hauptsächlich von nachtaktiven Insekten bestäubt. Sie duften besonders stark in der Nacht (Loughrin et al. (1991)). Die bisher untersuchten Tagdufter (Citrus aurantium, Odontoglossum constrictum) zeigen keinen endogenen Rhythmus der Duftabgabe. Beispiele für Duftrhythmen sind unter Spezialthemen Abschnitt 20 zu finden. Substanzen werden von höheren Pflanzen auch als SOS-Signale abgegeben, um sie vor Tierfraß zu schützen: Diese Duftstoffe locken natürliche Feinde der Fraßinsekten an, zum Beispiel Schlupfwespen. Schlupfwespen werden aber auch durch Geruchstoffe des Kots von Raupen ('Kairomone', Tumlinson et al. (1993)) angelockt.

#### 9.5.1 Blütenduft

Mindestens 30% aller höheren Pflanzen bilden flüchtige Substanzen. In höherer Konzentration sind sie für die Pflanzen toxisch. Sie werden deshalb als ätherische Öle in speziellen Zellen der Oberfläche von Blüten, Blättern, Stängeln und sogar Wurzeln gelagert. Bei manchen Pflanzen werden die Duftstoffe in Duftdrüsen (Osmophoren) gesammelt. Diese und andere Duftmale locken die Bestäuber zusammen mit den farbigen Saftmalen an die Stellen, die für die Bestäubung wichtig sind. Insektenblumen benutzen dabei andere Farben und Düfte als Vogel- und Fledermausblumen. Düfte und Duftmale wirken am Tage auf die



Abbildung 9.4: Die Duftproduktion bei *Stephanotis floribunda* im Headspace gemessen. Die Duftstoffe Methylbenzoat und Linalool werden zu etwa der gleichen Tageszeit abgegeben, wenn auch in unterschiedlichen Mengen. 1-Nitro-2-Phenylethan dagegen ist gegenüber den beiden anderen Duftstoffen um 12 Stunden verschoben. Nach Matile and Altenburger (1988). D112/stephanotis-duft

Befruchter auf geringere Entfernungen und erleichtern die Orientierung innerhalb der Blüte (Osmotaxis). Nachtblühende Arten haben dagegen einen intensiveren Geruch, der stark zunimmt, wenn die Dunkelheit beginnt. Nachtaktive Motten wie zum Beispiel die Sphingiden werden durch Duftstoffe zum Landen stimuliert (Brantjes (1973), Brantjes (1978)). Außerdem sind die Blüten von Nachtblühern weiß gefärbt. Sie können dadurch leichter von fliegenden Insekten gefunden werden.

Blütendüfte sind in der Regel aus vielen Substanzen zusammengesetzt. Am häufigsten sind Isoprenoide (=Terpenoide) und Benzenoide (Abbildung 9.5). Außerdem kommen aliphatische Verbindungen und Substanzen mit Heteroatomen vor. Stickstoff-haltige Verbindungen wie Indol oder Methylanthranilat können den Blütenduft stark beeinflussen. Auch Schwefelhaltige Verbindungen kommen in manchen Blüten vor. Duftstoffe werden für die Parfümindustrie verwendet. Man extrahiert sie mit Lösungsmitteln oder Wasserdampf. Viele Duftstoffe werden heutzutage auch synthetisiert.

# 9.6 Wirtschaftliche Bedeutung der Bestäubung: Blattschneiderbiene *Megachile*

Die Bestäubung von Blüten durch Insekten hat große wirtschaftliche Bedeutung. Viele Kulturpflanzen wie zum Beispiel die Obstbäume sind darauf angewiesen.

Wir wollen die Bedeutung von Insekten für die Bestäubung am Beispiel der Luzerne ansehen (Dorn and Weber (1988)). Luzerne ist vor allem in den Vereinigten Staaten von Nordamerika ein wichtiges Futtermittel. Um Samen zu erhalten, müssen große Luzernefelder bestäubt werden. Bienen eignen sich nicht dafür. Sie werden durch einen 'Auslösemechanismus' der Blüten abgeschreckt. 1930 gelangte die Blattschneiderbiene Megachile rotundata (Hymenoptera: Apoidea) nach USA (Abbildung 9.6). Sie stammt ursprünglich aus Osteuropa und Westasien. Sie lebt solitär und bestäubt sehr erfolgreich Luzerne. Außerdem benutzen sie Blattstücke der Luzerne, um ihre Brutzellen in hohlen Stängeln oder leeren Schneckengehäusen damit auszukleiden. Auf ein Pollen-Nektar-Gemisch wird auf die oberste Nektarschicht ein Ei abgelegt und mit einem Blattstück abgeschlossen. Weitere Brutzellen werden gebaut und mit Eiern versehen, bis der verfügbare Raum verbaut ist. Mit einem Blattstück wird dann das ganze Kunstwerk versiegelt. Um Luzerne auf einem Hektar Land zu bestäuben, werden 5000 Weibchen gebraucht. Es gibt inzwischen eine ganze Industrie, die Megachile anzieht und verkauft. Es lohnt sich für den Bauern, denn statt 1-3.5 dt werden mit den Blattschneiderbienen 22 dt Luzernesaat pro Hektar gewonnen.

Megachile überwintert als Vorpuppe. Diese Diapause wird nicht, wie bei den meisten Diapause-Beispielen (siehe Seite 259), durch die Tageslänge induziert, sondern durch einen Thermoperiodismus (Tweedy and Stephen (1971)). Die Diapause findet in einem dicht gesponnenen Kokon als Präpuppe (La3) statt. Der Kokon ist von Blattstücken umgeben (Abbildung 9.7) und befindet sich in einer dunklen Höhle oder einem Loch. Auch bei Tieren in einer Gelatinekapsel findet man keine Tageslängeneffekte. Bei 7<sup>0</sup>C kann die Diapause bis zu zwei Jahren dauern. Sie wird durch Temperaturen über  $17^{0}$ C gebrochen (A17 (1965)). Die Larve kaut sich durch die Zelle. Auch der Schlüpfrhythmus ist unempfindlich auf Licht-Dunkel-Wechsel. Eine Atmungsrhythmik wurde gemessen, die im Larvenstadium ultradian, im Adultstadium circadian ist. Sie zeigt ebenfalls keine Reaktion auf Licht, wohl aber auf Temperaturpulse. Ei-



Abbildung 9.5: Chemische Formeln einiger Duftstoffe: Geraniol, Limonen, Thymol und  $\alpha$ -Pinen. Aus Hess (1990). E113/duftstoffe



Abbildung 9.6: Blattschneiderbiene *Megachile rotundata*, ein wichtiger Befruchter von Luzerne-Blüten. Nach Dorn and Weber (1988). E114/megachile ne Temperaturpuls-Phasenresponsekurve wurde aufgestellt. Zum Thermoperiodismus siehe auch Saunders (1973b).



Abbildung 9.7: Megachile rotundata in Hüllen, die vom Muttertier aus Blattstücken gebildet und mit Pollen gefüllt werden, bevor das Ei abgelegt wird. Die Larven entwickeln sich im Larvenstadium 3 zu einer Präpuppe. Ein dichter Kokon wird gesponnen, in dem die Diapause stattfindet. Induktion der Diapause thermoperiodisch. Zwei Hüllen sind geöffnet, um die Tiere erkennen zu können. E114A/megachilekokon

# Kapitel 10

# Sonnenkompaßorientierung

Verschiedene Insekten und andere Tiere benutzen die Richtung der Sonne zu ihrer Orientierung. Bienen können ihre Mitarbeiter über die Richtung und Entfernung der Futterguelle zum Stock informieren. Der Amphipode Talitrus benutzt einen Sonnenkompass für seine Orientierung am Strand. Bei einem anderen Amphipoden, Talorchestia, der in Äquatornahen Gebieten lebt, funktioniert der Kompass auch, wenn die Sonne den Himmel nördlich statt südlich des Himmelsbogens umwandert. Andere Beispiele von Sonnenkompassorientierung werden erwähnt.

Wenn Insekten Pollen und Nektar suchen, müssen sie Signale der Pflanzen wahrnehmen. Sie können aber auch frühere Erfahrungen benutzen oder sogar -bei Bienen- die Erfahrungen anderer Arbeiterinnen übernehmen. Um Zeitund Kräfte-sparend an die Tracht zu kommen, benutzen sie zur Orientierung einen Sonnenkompaß.

Entdeckt wurde die Sonnenkompaßorientierung durch Santschi (1911) und Brun (1914) bei ihren Untersuchungen an Ameisen. Dann wurde die Sonnenkompaßorientierung auch bei Bienen (Frisch (1950)) und Vögeln (Kramer (1953), Vogelzug siehe Berthold (2001)) gefunden und untersucht. Später wurde diese Fähigkeit der Orientierung an zahlreichen weiteren Tiergruppen beobachtet. Eine gute Übersicht gibt Schmidt-Koenig (1975). Wir werden hier zwei Beispiele bringen, die Sonnenkompaßorientierung der Bienen und die von Strandflohkrebsen.

## 10.1 Sonnenkompaßorientierung und Kommunikation bei Bienen

Bienen benutzen bei der Nahrungssuche die Sonne zur Orientierung. Wenn sie die Information über Nahrungsquellen an andere Bienen weitergeben (Rund- und Schwänzeltanz), können sie nicht nur die Art der Nahrung (Duft, Pollen), die Qualität und die Menge übermitteln, sondern auch die Richtung und Entfernung. Andere Bienen finden dadurch die Nahrung schneller und energiesparender. Um die Richtung zu übermitteln, wird der Winkel der Nahrungsquelle zur Sonne im Schwänzeltanz kodiert. Da es im Bienenstock dunkel ist, wird die Richtung der Sonne als senkrecht nach oben angenommen und der Winkel zur Sonne durch die Richtung des Schwänzellaufes angezeigt (Abbildung 10.1). Diese Sonnenkompassorientierung funktioniert auch noch bei bedecktem Himmel mit kleinen offenen Himmelsstücken. Die Biene benutzt dann das Polari-



Abbildung 10.1: Sonnenkompassorientierung der Honigbiene und Schwänzeltanz. Im oberen Teil steht das Futter in Richtung der Sonne. Die Arbeiterinnen projizieren diese Richtung auf der senkrecht stehenden Wabe im dunklen Stock nach oben. Sie teilen anderen Arbeiterinnen die Richtung mit, indem sie in der dargestellten Weise einen 'Schwänzeltanz' vollführen. Auf der Achterbahn laufen sie seitlich nach unten, dann in der Mitte nach oben mit schwänzeln (wie häufig geschwänzelt wird, steht für die Entfernung der Futterquelle), und dann wieder seitlich nach unten. Im unteren Teil steht der Futterplatz  $60^0$  links von der Sonne. Der Schwänzellauf ist dementsprechend um  $60^0$  nach links geneigt. Nach Frisch (1965). E115/sonnenkompass-biene

sationsmuster des Himmels und kann daraus die Sonnenrichtung ermitteln. Werden einzelne Bienen auf der Rückkehr von einer Nahrungsquelle zum Bienenstock weggefangen und einige Zeit im Dunkeln gefangen gehalten, können sie die Richtung der Nahrungsquelle trotzdem korrekt weitergeben. Da sie während der Gefangenschaft das Weiterlaufen der Sonne nicht beobachten konnten, müssen sie eine innere Uhr besitzen, die die 24-Stunden-Rhythmik des Sonnenganges besitzt. Auch andere rhythmische Ereignisse des Bienenlebens werden mit dieser Uhr gesteuert, wie die Erinnerung an Düfte und an Nahrungsquellen nach 24 Stunden.

Die Sonnenkompaßorientierung dient den Bienen also zur Orientierung im Raum, zum Nahrungssammeln und zur Verständigung.

## 10.2von Strandflohkrebsen

Küsten haben Zonen mit unterschiedlichen physikalischen und biologischen Eigenschaften ('Okotonales System'). Sie verschieben sich periodisch durch die Gezeiten und aperiodisch durch Stürme. In diesen Zonen lebt eine spezielle Fauna. Sie muss sich an diese ständig wechselnden Lebensbedingungen anpassen. Manche Organismen halten sich in spezifischen Zonen auf oder versuchen, diese zu erreichen. Andere dagegen durchwandern die Zonen und zeigen dabei unterschiedliches Verhalten.

Der Strandflohkrebs Talitrus saltator Montagu gehört zu den Amphipoden (Malacostracae), eine Ordnung der Krebstiere (Abbildung 10.2). Er ist häufig an den europäischen Küsten im feuchten Sand zu finden (Abbildung 10.3). Er lebt am Strand in der Nähe der Hochwasserlinie. Tags vergräbt er sich im feuchten (nicht zu nassen) Sand. Er macht nachts bis zu 100 Meter

Wanderungen ins Inland. Wird es zu trocken, flieht er zum Wasser. Dazu braucht er nicht das Meer zu sehen. Er kann die Sonne als Kompass benutzen, wie Spiegelversuche und Versuche mit künstlichen Sonnen (Lichtquellen) zeigen (Pardi and Papi (1952)). Dabei dient nur der Azimut und nicht die Höhe der Sonne zur Orientierung. Unterschiede im Azimut (geographische Breite, Jahreszeit, Nord- oder Südhalbkugel) werden mit einkalkuliert. Sie müssen nicht, wie bei Ameisen (Jander (1975)) erst erlernt werden.

Die Fluchtrichtung der jeweiligen Population hängt von der Küstenrichtung ab. Sie ist für die speziellen Populationen genetisch festgelegt. Werden Tiere mit verschiedenen Fluchtrichtungen miteinander gekreuzt, benutzen die Nachkommen eine intermediäre Fluchtrichtung. Statt der Sonne kann auch das Muster des polarisierten Lichtes am Himmel zur Orien-Sonnenkompaßorientierung<sup>tierung benutzt</sup> werden. Weitere Orientierungs-

hilfen sind die Neigung des Strandes, Landmarken, ein Magnetkompaß. Ohne diese zusätzlichen Hilfen ist die astronomische Richtungsweisung schlechter.

In der Nacht wird der Mond zur Orientierung benutzt (Papi and Pardi (1953), Papi (1960)). Das funktioniert auch noch nach einigen Tagen Dauerdunkel vor dem Test (Papi (1960)). Dabei wird zum Zeitmessen keine 'Sanduhr' benutzt, sondern ein Oszillator mit einer Periodenlänge von 24 Stunden und 50 Minuten (Enright (1972)).

Mit einem einfachen Versuch (Pardi and Scapini (1987)) wurde gezeigt, dass die Tiere zur Orientierung die Sonne benutzen. Dazu werden Strandflohkrebse gefangen und in die Mitte eines Glaskolbens gebracht. Er erlaubt den Tieren, die Sonne zu sehen, aber nicht das Meer und das Land. Unter diesen Bedingungen würden sie jetzt in die Fluchtrichtung springen. Wird nun die Sonne durch eine Pappe abgeblendet und mit einem Spiegel von einer an-



Abbildung 10.4: Sonnenkompaßorientierung des Strandflohkrebses *Talitrus saltator*. Er kann sich nach der Sonne orientieren, wenn es zu trocken oder zu nass wird (links). Wird die Sonne mit einem Spiegel umgelenkt, richtet *Talitrus* sich nach der Spiegel-Sonne (rechts). Nach Pardi and Scapini (1987). E117/spiegel-talitrus



Abbildung 10.2: Strandfloh *Talitrus saltator* (Amphipoden), ein Krebstier. Nach Pardi and Scapini (1987). 116b/sonnenkompass-talitrus



Abbildung 10.3: Strand-Biotop des Strandflohkrebses *Talitrus saltator*. Nach Pardi and Scapini (1987). 116a/talitrus-biotop deren Seite auf die Tiere gelenkt, flüchten sie so, als ob die Spiegelsonne die echte wäre (Abbildung 10.4). Diese Krebse sind in der Lage, den augenblicklichen Winkel zur Sonne festzustellen und daraus die Fluchtrichtung abzuleiten. Wenn die Tiere sich wirklich nach der Sonne orientieren, müssen sie aber ihren Orientierungswinkel allmählich ändern. Denn die Sonne wandert ja vom Osten nach Westen. Das können sie tatsächlich: Die Sonnenwanderung wird von den Tieren einkalkuliert. Sie müssen also eine Uhr besitzen, die als Zeitreferenz dient. Verschiebt man den Licht-Dunkel-Wechsel der Tiere durch eine künstliche Beleuchtung, die nicht mit dem natürlichen Tag übereinstimmt, wird ihre Zeitreferenz auch verschoben. Die Orientierung der Tiere verändert sich dann entsprechend (Abbildung 10.5).

#### 10.2.1 Sonnen- und Mondorientierung am Äquator

Wie sich Talorchestia martensii orientiert, wurde am indischen Ozean in Somalia und Kenia untersucht. Die Tiere leben zwischen dem oberen Supralitoral und dem unteren Eulitoral. Sie sind an die dortigen Gezeiten mit einer tidalen und einer diurnalen Komponente angepasst. In Äquatornähe läuft die Sonne je nach Jahreszeit südlich oder nördlich. Somit gibt es starke Unterschiede im Azimut. Trotzdem können sich die Tiere nach einem Sonnenkompass orientieren. Zusätzlich wird eine Magnetorientierung benutzt (Pardi and Scapini (1987)).

## 10.3 Weitere Beispiele für Sonnenkompaßorientierung

Auch bei Ameisen (Santschi (1911), Brun (1914), neuere Arbeit Wehner (1998)) und Spinnen (Papi (1955)) wurde Sonnenkompaßorientierung nachgewiesen. Die Uferspinne Arc-



Abbildung 10.5: Verschiebt man den Licht-Dunkel-Wechsel der Strandflohkrebse Talitrus durch eine künstliche Beleuchtung, die nicht mit dem natürlichen Tag übereinstimmt, wird die Zeitreferenz der Tiere auch verschoben und ihre Orientierung verändert sich entsprechend: Ein um 6 Stunden verfrühter Licht-Dunkel-Wechsel (oben) ändert die Synchronisation der Tagesuhr der Tiere so, dass sie morgens um 6 Uhr (ihr Mittag) in Richtung Sonne flüchten und um 12 Uhr so laufen, wie die Kontrollen (Mitte) es abends tun würden (es ist auch ihr Abend). Ein um 6 Stunden verspäteter Licht-Dunkel-Wechsel (unten) ändert die Synchronisation der Tagesuhr der Tiere so, dass sie um 12 Uhr (ihr Morgen) nach Osten flüchten statt nach Süden. Um 18 Uhr laufen sie so, wie die Kontrollen (Mitte) es mittags tun würden (es ist ja auch ihr Mittag). Die Orientierung richtet sich also nach der inneren Uhr. Nach Pardi and Scapini (1987). E118/zeitreferenz-talitrus

tosa cinerea kommt an europäischen Flüssen von Finnland bis zu den Mittelmeerländern vor. Italienische Populationen konnten sich in Skandinavien im Sommer zu Sonnenzeiten, die ihnen unbekannt waren, nicht orientieren. Die lokalen skandinavischen Populationen orientieren sich dagegen auch zur Mitternachtssonne.

Wanderheuschrecken gehören zu den Acrididae. Es gibt zehn typische Wanderheuschreckenarten. Locusta migratoria ist die häufigste. Die Schwärme können einige tausend Kilometer weit wandern. Sie folgen dabei dem Wind, orientieren sich aber auch nach Sonne und Mond.

Unter den Schmetterlingen macht der Monarch (*Danaus plexippus*) im Spätsommer und Herbst Wanderungen bis zu 3000 km. Auch hierbei wird ein Sonnenkompaß verwendet.

# Kapitel 11

# Uhren, die nach dem Mond gehen

Nachdem kurz erklärt wird, wie Gezeiten entstehen und wie diese die Küsten-Biotope beeinflussen, werden Beispiele für tidale Rhythmen beim Isopoden Excirolana, für 14-Tage Rhythmen bei einer terrestrischen Krabbe und dem Schlüpfen von Clunio vorgestellt. Schließlich werden Monatsrhythmen und ihre Bedeutung für Meeresorganismen erklärt.

Während die Erde im Laufe eines Jahres um die Sonne wandert, dreht sie sich in 24 Stunden um ihre Achse. Ihr Trabant, der Mond, braucht 24.8 Stunden, um einmal um die Erde zu kreisen. Die Konstellation Erde-Mond-Sonne ändert sich also ständig, aber regelmäßig. Nach Newtons Gravitationsgesetz (k =  $m_1 * m_2/d^2$ , wobei k die Anziehungskraft,  $m_1$  die Masse des Körpers 1, m<sub>2</sub> die Masse des Körpers 2, d der Abstand zwischen den beiden Körpern ist) ziehen sich zwei Himmelskörper wie zum Beispiel Erde und Mond gegenseitig an. Die Anziehungskraft nimmt mit dem Quadrat der Entfernung zwischen den beiden Körpern ab. Das ist in Abbildung 11.1 für den Punkt A auf der Erdoberfläche Richtung Mond, den Erdmittelpunkt M, und den Punkt B auf der dem Mond entgegengesetzten Seite durch die verschiedenen Größen der Pfeile dargestellt.

Jeden Tag werden zwei Gezeiten der Ozeane beobachtet. Wie entstehen diese? Die Anzie-

hungskraft des Mondes könnte für die Anziehung der Wassermassen auf der dem Mond zugewandten Seite verantwortlich sein. Mond und Erde drehen sich um ihren gemeinsamen Schwerpunkt einmal pro siderischen Monat (27 Tage 7 Stunden 43 Minuten). Da der gemeinsame Schwerpunkt nicht der Schwerpunkt der Erde ist, sondern er sich etwa dreiviertel des Erdradius davon entfernt befindet (roter Punkt S in Abbildung 11.1), entstehen Zentrifugalkräfte. Sie könnten für die zweite Tide auf der Mond-abgewandten Seite der Erde verantwortlich sein. Diese Erklärung ist aber falsch. Zunächst einmal ist die Anziehungskraft der Erde, die das Wasser an unseren Planeten bindet, 300 000 mal stärker als die des Mondes. Der Mond ist deshalb nicht in der Lage, die Wassermassen der Ozeane zu heben. Zweitens sind die Tiden auf der Mond-abgewandten Seite fast genauso hoch (nur 4% weniger) als die Tiden auf der Mond-zugewandten Seite. Drittens sind die Zentrifugalkräfte des Erde-Mond-Systems sehr gering und können nicht das Heben der Wassermassen auf der Mond-abgewandten Seite erklären.

Die richtige Erklärung für das Zustandekommen der Gezeiten ist folgende (siehe Abbildung 11.1): Im Punkt A hebt sich das Wasser, weil der Mond das Wasser stärker beschleunigt als es die Erde tut. Da unser Planet sich schneller dreht als der Mond, werden die Wassermassen tangential von der festen Erdkugel weggezogen.



Abbildung 11.1: Gravitationskräfte (rote Pfeile) des Mondes (gelb) an verschiedenen Stellen der Erde. In A sind sie stärker als in M, dem Mittelpunkt der Erde (x), und in M stärker als am Ort B auf der entgegengesetzten Seite der Erde. Der Mittelpunkt der Erde M dreht sich um den gemeinsamen Schwerpunkt S (roter Punkt) des Systems Erde-Mond. Das Wasser der Meere (blau) wird durch die sich verschiebenden Anziehungskräfte des Mondes von C und D weggezogen. Es ergeben sich zwei Gezeiten pro Tag (im Abstand von 12.4 Stunden). Das Wasser wird dabei nicht angehoben (Dazu wären die Anziehungskräfte viel zu gering), sondern tangential von C und D nach A und B verschoben. Nach Keller (2001). E119A/gezeiten

Im Punkt B bleibt das Wasser wegen seiner Massenträgheit zurück, während die feste Erdkugel unter dem Wasser weggezogen wird. Auf diese Weise bewegt sich das Wasser von den Punkten C und D weg zu den Punkten A und B. Der Mond hebt also nicht das Wasser an, sondern bewegt es tangential über die Erdoberfläche. Die Periode zwischen zwei Tiden beträgt 12 Stunden und 25 Minuten.

Zusätzlich werden die Gezeiten auch durch die Sonne beeinflusst. Sie ist 400 mal weiter entfernt als der Mond, hat aber eine 1800 mal stärkere Anziehungskraft. Da aber die Gravitationsbeschleunigung proportional zum Reziproken der dritten Potenz der Entfernung ist  $(b = 2Gr * m/l^3)$ , wobei b die Gravitationsbeschleunigung ist, G die Gravitationskonstant, r der Erdradius, und l die Entfernung zwischen Erde und Sonne), beträgt die Gravitationsbeschleunigung nur 45% der des Mondes. Während der Syzygien (Vollmond, Neumond) addieren sich die Kräfte des Mondes und der Sonne und führen zu Springtiden, während zur Zeit des Halbmondes die Kräfte der Sonne die des Mondes reduzieren und Nipptiden resultieren (Abbildung 11.2).

Die Gezeiten auf der Erde werden ferner kompliziert durch den elliptischen Umlauf des Mondes um die Erde. Während des Perigäums ist der Mond 9 bis 14 % näher an der Erde als zu Zeiten des Apogäums. Die Wirkung der Gezeiten sind deshalb 30 bis 48 % stärker. In Verbindung mit Syzygien entstehen extreme Tiden ('perigäische Springtiden´).

Andere Faktoren beeinflussen die Gezeiten. Die stärkste Fluthebung findet man am sublunaren Punkt (der Ort auf der Erdoberfläche, über dem der Mond den Zenit durchläuft); dieser Ort hängt von der Deklination des Mondes ab.

Eine ganze Reihe von Rhythmen beeinflussen die Gezeiten: Der halbe lunare Tag (12 Stunden 25 Minuten), der halbe Sonnentag (12 Stunden), der halbe synodische Monat (14.77 Ta-



Abbildung 11.2: Monatliches Auftreten von Spring-und Nipptiden. Stehen Mond und Sonne mit der Erde auf gleicher Linie (Neumond oder Vollmond, oberer Teil), verstärken sich die Gezeiten (*Springtiden*). Stehen Mond und Sonne senkrecht zur Erde (erstes und letztes Mondviertel), sind die Tidenhöhen geringer (*Nipptiden*). Dadurch ändern sich die Tidenhöhen im Laufe eines Monats (unten, MHT: Mittleres Hochwasser, MLT: Mittleres Niedrigwasser, MSH: Mittleres Spring-Hochwasser, MSN: Mittleres Spring-Niedrigwasser, MNH: Mittleres Nipp-Hochwasser, MNN: Mittleres Nipp-Niedrigwasser, in Metern, Ordinate). Nach Palmer (1974). D119/gezeiten

ge), der halbe siderische Monat (13.66 Tage), der anomalistische Monat (27.55 Tage), die halbe jährliche Variation der Sonnendeklination (182.6 Tage), das anomalistische Jahr (365.26 Tage), das prograde Jahr (8.8 Jahre), die retrograde Änderung der Knotenlinie (18.6 Jahre).

Tidale Effekte finden sich vor allem an den Meeresküsten. Geophysikalische Faktoren wie Resonanzeigenschaften der Ozeane, Strömungen, Küstenverlauf, lokale Eigenheiten wie trichterförmige Flussmündungen beeinflussen das Gezeitenmuster und die Höhe der Tiden. Wegen dieser Faktoren und ihren verschiedenen Kombinationen kann der Gezeitenhub, der auf dem offenen Ozean nur 35 cm beträgt, sich an den Küsten akkumulieren und Höhen bis zu 4 m (deutsche Nordsee), 7 m (Französische Atlantikküste) und 21 m (bestimmte trichterförmige Flussmündungen) erreichen.

Die Art der Gezeitenbewegung kann sehr unterschiedlich sein: Meistens bestehen sie aus zwei Ebben und zwei Fluten pro Tag, aber Mischformen und Gezeiten mit nur einem täglichen Wechsel zwischen Ebbe und Flut gibt es auch. Siehe Barnwell (1976) für eine Übersicht.

Im Eulitoral (Zone zwischen höchster Flut und tiefster Ebbe) ändern sich die Bedingungen drastisch (Abbildung 11.3). Je nachdem, ob diese Zone der Brandung ausgesetzt ist oder vor ihr geschützt ist, ob die Küste flach oder steil ist, unterscheiden sich Temperatur, Feuchte, Überflutung, Sauerstoffgehalt und Nahrungsangebot, Salzgehalt, Druck, Wellenschlag und Lichtbedingungen. Siehe Newell (1979) für eine Übersicht. Die Gezeitenunterschiede können nur wenige Zentimeter oder aber mehr als zehn Meter betragen. Ist die Küste sehr flach, kann die Gezeitenzone einige Kilometer breit sein.

An diese Gezeiten müssen sich die Organismen der Küsten und Meere anpassen. Wir finden deshalb bei ihnen Gezeitenrhythmen, vierzehntägige und 28tägige Rhythmen. Im folgenden werden wir einige Beispiele für Gezeitenrhythmen, Vierzehntagesrhythmen und Monatsrhythmen kennen lernen (Neumann (1981), Palmer (1974), Brady (1982), Palmer (1995)).

#### 11.1 Gezeitenrhythmen

Gezeitenrhythmen sind bei Krabben (Winkerkrabben), Krebsen (Carcinus, Emerita, lokomotorische Aktivität und Farbwechsel des Panzers), Milben am Meeresstrand, und bei Muscheln (Napfschnecke *Patella*) weit verbreitet. Gezeitenrhythmen sind bisher relativ selten bei Insekten gefunden worden. Ein Landkäfer, Thalasotrechus barbarae, gehört dazu. Bei einer Höhlenschrecke (Ceuthophilaus maculatos) sollen angeblich auch Gezeitenrhythmen gefunden worden sein. Fische (Blennius) zeigen tidale Rhythmen (Gibson (1965), Gibson (1967), Gibson (1971)) und Vögel wie der Riff-Reiher, der tidal ans Meer fliegt (A18 (n.d.)). Sogar bei einzelligen Algen sind Gezeitenrhythmen bekannt: Die Vertikalwanderung der Diatomee Hantzschia virgata (Palmer (1976)) und von Euglenoiden Algen (Palmer and Round (1967)). Am Beispiel von Excirolana chiltoni,



Abbildung 11.4: *Excirolana chiltoni* (Isopode) von der Kalifornischen Küste. 121/Excirolana

einem Isopoden der Kalifornischen Küste (Ab-


Abbildung 11.3: Supra-, Eu- und Infralitoral an der Meeresküste mit mittlerem Hochwasserstand der Spring- (MHWS, blaue Linie) und der Nipptiden (MHWN) und mittlerem Niedrigwasserstand der Nipp- (MNWN) und Springtiden (MNWS). Mittlerer Wasserstand blau gestrichelt. Nipptiden nach Halbmond, Springtiden nach Voll- und Neumond. Die roten Pfeile während des Niedrigwassers zu Springtiden geben die Tage an, an denen *Clunio* Mücken schlüpfen (Seite 193). Nach Caspers (1951) und Neumann (1966). E120/gezeitenzone



Abbildung 11.6: Das Aktivitätsmuster des Schwimmverhaltens von *Excirolana aus Abbildung* 11.5 wurde verdoppelt, sodass Tag 1 und Tag 2, Tag 2 und Tag 3, Tag 3 und Tag 4 und so weiter sich nebeneinander befinden. Linie 1 verbindet eine der täglichen Hochwasserzeiten, Linie 2 die zweite tägliche Hochwasserzeit. Die kleinen Punkte markieren Tage mit maximaler Springtide. Die schräg markierten Flächen zeigen die täglichen Hochwasser-Zeiten. Die eingekreisten Flächen A bis I sind Zeiten erhöhter Aktivitäten und stimmen recht gut mit dem Gezeitenmuster überein, wie es durch die Linien 1 und 2 und die schraffierten Gebiete wiedergegeben wird. Nach Enright (1972). D122A/excirolana-muster

bildung 11.4), wird die erstaunlich genaue zeitliche Einpassung des Aktivitätsmusters an die Gezeitenform sichtbar (Abbildungen 11.5 und 11.6). Während der Ebbe ist das Tier im Sand vergraben, während der Flut schwimmt es für etwa zwei Stunden herum, um Nahrung aufzunehmen. Die Intensität der Aktivität hängt von der Fluthöhe ab. Das Verhalten ist im Labor in Petrischalen mit Sand simulierbar. Selbst dann wird noch das gemischte Semi-diurnale Gezeitenmuster der kalifornischen Küste nachvollzogen. Es handelt sich dabei nicht um eine direkte Folge von Zeitgebern, da die Aktivitätsrhythmik im Labor allmählich außer Phase mit den natürlichen Verhältnissen kommt. Als Zeitge-



Abbildung 11.5: Aktivitätsmuster des Schwimmverhaltens von *Excirolana chiltoni*, einem 'virtuosen' Isopoden der Kalifornischen Küste. Das Aktogramm gibt die tägliche Aktivität eines Tieres (Tag 1 bis 65 untereinander) wieder. Nach Enright (1972). D122N/excirolana-muster ber für die Synchronisation dieses endogenen Rhythmus könnten im natürlichen Biotop Druckunterschiede durch periodisches Eintauchen, Wasserwechsel und damit verbundene chemische Konzentrationsunterschiede (zum Beispiel im Salzgehalt), Temperaturunterschiede oder Wasserturbulenz in Frage kommen. Der Licht-Dunkel-Wechsel hat bei Gezeitenrhythmen verständlicherweise keinen synchronisierenden Effekt. Es zeigte sich, dass bei Excirolana Wasserturbulenz als Zeitgeber wirkt. Sie lässt sich simulieren, wenn man die Gefäße mit Wellensimulatoren (Schüttler, Magnetrührer, Klapow (1972)) schüttelt. Die Länge der Schüttelperiode bestimmte die Form des Rhythmus: Wenn ein längerer Reiz und ein kürzerer Reiz mit tidalem Abstand gegeben werden, bewirkt der längere einen stärkeren Aktivitätsschub als der kürzere (Abbildung 11.7).

Eine Phasenresponsekurve auf Schüttelpulse, die zu verschiedenen Zeiten des Tages unter konstanten Bedingungen gegeben wurden, erstellte Enright.

Verspätungen treten sofort auf, Verfrühungen erst nach mehr als 2 Übergangszyklen. Die Bimodalität der Aktogramme wird verstärkt, wenn der Reiz in die Mitte der beiden vorhandenen Aktivitätsperioden fällt.

Die Kurve auf einzelne Turbulenzreize hat zwei Gipfel pro Tag (Enright in DeCoursey (1976), siehe Abbildung 11.8). Enright interpretiert die zweigipflige Kurve als durch die Gezeiten synchronisierten bimodalen circadianen Rhythmus. Andere glauben jedoch, dass es sich dabei um einen Gezeitenrhythmus handelt, während wieder andere einen circalunidianen Rhythmus annehmen (diskutiert auf Seite 112 von Palmer (1995)).

Alkohol und schweres Wasser  $D_2O$  verlängern die Periodenlänge des tidalen Rhythmus (Enright (1971b), Enright (1971a)).

Temperaturkompensation von Gezeitenrhyth-



Abbildung 11.7: Bei *Excirolana chiltoni* wurde eine lange Schüttelperiode (120 Minuten) 6 Stunden später von einer kurzen Schüttelperiode (30 Minuten) abgelöst (linker Teil der Abbildung). Dann wurde die Schwimmaktivität der Tiere unter konstanten Bedingungen ohne Schüttelperiode gemessen. Es ergibt sich das Schwimm-Muster im unteren Teil links mit hohen Aktivitäten und 6 Stunden später mit weniger hohen Aktivitäten. Werden dagegen erst kurze und dann lange Schüttelperioden gegeben (rechter oberer Teil der Abbildung), dann folgen auf weniger hohe Aktivitäten 6 Stunden später hohe Aktivitäten (rechter unterer Teil der Abbildung). Die Form des Gezeitenrhythmus spiegelt sich dadurch im Aktivitätsmuster wieder. Nach Klapow (1972). D123/excirolana-schuetteln



Abbildung 11.8: Die Schwimmaktivität von Excirolana chiltoni wurde an Einzeltieren oder in Gruppen für drei bis vier Tage im Freilauf gemessen. Dann wurde den Tieren oder Gruppen zu verschiedenen Phasen des Zyklus (Abszisse) zwei Stunden lang ein Gezeitenreiz in Form von Schütteln (jede Minute für 10 Sekunden) gegeben. Danach wurde wieder die Schwimmaktivität unter konstanten Bedingungen gemessen. Die Verschiebung des Rhythmus gegenüber dem Rhythmus vor den Reizen wurde als Verfrühung (y-Achse nach oben) oder Verzögerung (y-Achse nach unten) in der Phasenresponsekurve aufgetragen. Nach Enright in De-Coursey (1976). D124/prc-Excirolana men wurde an *Excirolana chiltoni* (A19 (n.d.)) und *Carcinus maenas* nachgewiesen (Naylor (1963)).

Gezeitenrhythmen wurden nicht nur bei Organismen an den Meeresküsten gefunden, sondern auch im Inland. Zürcher and Cantiani (1998) zeigten, dass sich die Durchmesser von Holzstämmen parallel zu den Schwerkraft-Gezeiten im Inland (Schweiz) ändern (Abbildung 11.9).

## 11.2 Vierzehntägige Rhythmen

Wir werden zwei Beispiele kennen lernen, das Freisetzen der Larven bei der Landkrabbe Sesarma haematocheir und das Schlüpfen der Einstundenmücke Clunio marinus. Zum Vierzehntagesrhythmus gibt es zwei Filme: Über den Ährenfisch Leuresthes tennis (Walker (n.d.)) und über die Einstundenmücke Clunio (Neumann (1973)).

#### 11.2.1 Vierzehntagesrhythmus der Landkrabbe Sesarma haematocheir

Sesarma haematocheir ist eine Landkrabbe, die in Japan verbreitet vorkommt. Verschiedene Populationen leben in ganz verschiedenen Habitaten. Aber alle müssen dafür sorgen, dass ihre Larven ins Meer gelangen. Eine Population dieser Art lebt als Adulttier in den Bergen über dem Ogamofluß bei Kyoto. Die Krabben kopulieren im Sommer. Die Zygoten werden ausgeschieden und bleiben an Haaren auf der Unterseite des Abdomens der Weibchen kleben. Wenn die Larven sich bis zum Zoea-Stadium entwickelt haben, läuft das Weibchen am späten Nachmittag an den Fluss. Zur Dämmerung geht sie ins Wasser, hält sich an einem Stein fest und schlägt ihr Abdomen kräftig auf und



Abbildung 11.9: Der Duchmesser von Holzstämmen (Ordinate) ändert sich im Verlauf einiger Tage (Abszisse) parallel zu den Schwerkraft-Gezeiten im Inland (Schweiz). Nach Zürcher and Cantiani (1998). D121A/tides-stem

ab. Dadurch werden die Larven dazu gebracht, aus der Eimembran zu schlüpfen. Sie schwimmen die etwa 100 Meter des Flusses bis zur Mündung ins Meer und entwickeln sich dort im Salzwasser (längerer Aufenthalt im Süßwasser ist tödlich für sie) (Saigusa and Hidaka (1978)). Die Larven werden nur zur Abenddämmerung und besonders zahlreich an Tagen um den Vollund Neumond herum abgegeben (Abbildung 11.10). Auslöser dafür ist das Licht-aus-Signal. Aber was steuert den zweiwöchigen Rhythmus? Dazu wurden Versuche gemacht. Werden die Tiere im 14:10 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel bei 23<sup>0</sup>C gehalten, bleibt der vierzehntägige Rhythmus für etwa sechs Zyklen erhalten. Er wird also durch eine Zweiwochenuhr gesteuert. In einem weiteren Experiment wurde im 14:10 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel künstliches Mondlicht gegeben, jede Nacht um 50 Minuten später, wie es in der Natur geschehen würde. Allerdings war der künstliche Mondzyklus um sieben Tage gegen den natürlichen versetzt (Abbildung 11.11, Saigusa (1986)). Es zeigte sich, dass das künstliche Mondlicht den Rhythmus synchronisiert, mit dem die Zoea-Larven ins Wasser gelangen.

#### 11.2.2 Vierzehntagesrhythmus von *Clunio*

Die kleine marine Chironomide *Clunio marinus* kommt an den europäischen Küsten des Atlantik vor (eine Population auch in der Ostsee; sie verhält sich aber anders). Die Larven leben in Algenrasen im untersten intertidalen Bereich. Kurz vor einer Zeit der Springtiden verpuppen sich reife Larven. Drei bis fünf Tage später schlüpfen zur lokalen Ebbe die männlichen Tiere. Sie fliegen über das trocken gefallene Gebiet, bis sie ein Weibchen gefunden haben. Diese können nur mit Hilfe der Männchen aus der Puppenhülle schlüpfen (Abbildung 11.12). Sie sind flügellos und werden vom Männchen an





Abbildung 11.10: Zoea-Larven-Abgabe durch weibliche Landkrabben Sesarma haematocheir. Zahl der Weibchen, die Larven abgeben: Histogramme. Sonnenauf- und -untergang und Mondauf- und -untergang sind mit der ersten und zweiten Flut des Tages eingetragen. Neumond, Vollmond, Halbmond. Nach Saigusa (1986). D125/sesarma-r



Abbildung 11.11: Zoea-Larven-Abgabe durch weibliche Landkrabben Sesarma haematocheir. Der Licht-Dunkel-Wechsel wurde auf 6 Stunden später verschoben als in der Kontrolle (nicht gezeigt). Während die Kontrolltiere die Larven zur Zeit der ersten Flut (oben) oder der zweiten Flut (unten) abgeben würden, sind diese Zeiten um sechs Stunden verzögert. Da Gezeitenrhythmen nicht durch den Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert werden, muss die verstellte Tagesuhr die Monduhr verstellt haben. Nach Saigusa (1986). D126/sesarma geeignete Stellen gebracht, wo die befruchteten Eier als gallertiges Paket an Rotalgen abgelegt werden.





Diese Insekten benutzen also eine bestimmte Phasenbeziehung zwischen den beiden Umweltzyklen des Tages (mit 24 Stunden Rhythmus) und der Gezeiten (Rhythmus von knapp 15 Tagen). Der Wasserspiegel ist dann wegen der Springtide besonders niedrig. Ferner wird die Zeit der Ebbe gewählt. Damit ist gewährleistet, dass die Tiere schlüpfen und sich paaren, wenn das Substrat wirklich trocken gefallen ist. Die tidalen Muster an den Küsten des Atlantik und der Nordsee sind in Endres and Schad (1997) aufgezeigt. Jeden Tag kommen Ebbe und Flut 50 Minuten später. Alle 15 Tage ergibt sich durch die Amplitudenmodulation der Gezeiten die gleiche Phasenbeziehung und damit günstige Fortpflanzungsbedingungen bei Ebbe.

Als Mechanismen dienen dem Tier eine circadiane Uhr und eine vierzehntägige Uhr (Abbildung 11.13). Zeitgeber für den Tagesrhythmus ist der Licht-Dunkel-Wechsel. Zeitgeber des vierzehntägigen Rhythmus ist bei südlichen Populationen das Mondlicht. Nördlichere Populationen benutzen dagegen andere Zeitgeber.



Abbildung 11.13: Bei *Clunio marinus* wird das Verpuppen durch Signale einer vierzehntägigen Uhr und das Schlüpfen der Imago aus der Puppenhülle durch Signale einer circadianen Uhr gesteuert. Zeitgeber der circadianen Uhr ist der Licht-Dunkel-Wechsel, Zeitgeber der vierzehntägigen Uhr je nach Population Temperaturpulse (arktische Population), Mondlicht (südliche Population) oder Turbulenz des Wassers (Helgoländer Population). Die Turbulenz muss eine gewisse Zeit andauern und zu einer empfindlichen Phase der circadianen Uhr aufhören, damit die vierzehntägige Uhr von diesem Zeitgeber synchronisiert werden kann. Nach Neumann (1976) und Neumann (1988). E129/clunio-modell



Abbildung 11.14: Fundstellen von *Clunio marinus* von der Atlantik- und Nordseeküste (vergleiche mit Abbildung 11.15). Die Fundorte (deutsche Bucht - Helgoland, Normandie - Porten-Bessin, Bretagne - Quiberon, Baskenküste - St. Jean-de-luz und nordspanische Küste - Santander) sind in der Kartenskizze mit schwarzen Punkten markiert. Die Karte zeigt ferner die Längen-(oben) und Breitengrade (links) und die Flutstunden-Linien. Das sind Linien gleicher mittlerer Hochwasserunterschiede gegen den Meridiandurchgang des Mondes in Greenwich. Nach Neumann (1966). E130A/clunio-verbreitung

Die Sommernächte sind im Norden zu kurz und der Mond steht zu niedrig, um mit seinem Licht als Zeitgeber zu wirken. Stattdessen werden Wasserturbulenzen (50-200Hz) über Mechano-Rezeptoren perzipiert. Sie müssen bei Clunio mindestens 6 Stunden, optimal 8 Stunden einwirken. Das Ende der Turbulenz ist besonders wirksam. Das circadiane System ist zur Tagzeit für den Wechsel zwischen stärkerer und schwächerer Turbulenz empfindlich. Dieses Ereignis kommt nur alle 15 Tage vor. Es dient als zentralnervöses Filter, um den vierzehntägigen Oszillator zu steuern. Von Clunio gibt es verschiedene Küstenpopulationen. Alle schlüpfen zur Zeit des jeweiligen Springniedrigwassers (Vollmond oder Neumond). Es handelt sich um geographisch isolierte Zeit-Rassen (Abbildung 11.14). Je nach dem, wann an den verschiedenen Küsten die Ebben auftreten, schlüpfen die Tiere zu unterschiedlichen Tageszeiten. Kreuzungsversuche zeigen intermediäre Vererbung. Sie ist nicht monofaktoriell. Vielmehr sind zwei bis drei gleichartige Gene für diese Zeitunterschiede verantwortlich. Im Gehirn werden zu bestimmten Zeiten von den neurosekretorischen Zellen Hormone abgesondert, die den Schlüpfzeitpunkt am Tage bestimmen.<sup>1</sup> Die tageszeitliche Programmierung kann sich jahreszeitlich ändern. Bei Chironomus thumii ist das Temperatur-abhängig, bei Clunio tsushimensis photoperiodisch gesteuert (Oka and Hashimoto (1959)). Es gibt aber auch eine flexible tageszeitliche Programmierung durch Lernvorgänge (Zeitgedächtnis).

Physiologische Zeitmeßmechanismen ermöglichen also eine zeitliche Kopplung zwischen einer physiologischen Leistung und einem zyklischen Umweltfaktor. Er muss zuverlässig sein und der Organismus muss für ihn Rezeptoren haben. Die Umweltbedingungen, die letztlich das Zeitmaß dieser Kopplung setzen und für die



Abbildung 11.15: Das Schlüpfverhalten in Populationen von *Clunio marinus* von der Atlantik- und Nordseeküste ist rechts unten für Männchen (rot) und Weibchen (blau) dargestellt. Es ist in allen Fällen einige Stunden vor der örtlichen Niedrigwasserzeit (Pfeil mir Variation). Zu den Fundstellen (Deutsche Bucht - Helgoland, Normandie - Port-en-Bessin, Bretagne - Quiberon, Baskenküste - St. Jean-deluz und Nord-Spanische Küste - Santander) siehe Karte in Abbildung 11.14. Nach Neumann (1966). D130/clunio-varieties

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Ähnlich ist es beim Schlüpfen der Riesenseidenspinner (Truman and Levine (1981)).

Selektion zuständig sind, können ganz andere sein. Für die Selektionsbedingungen bei Clunio hat Tageslicht Zeitgeberfunktion (der unmittelbar wirksame Faktor oder ultimate Faktor). Selektionsfaktor für die richtige tageszeitliche Phasenbeziehung ist jedoch der Gezeitenzyklus (der mittelbar wirksame oder proximate Faktor). Bei Clunio-Populationen im Norden gibt es verschiedene Zeitgeber: Gezeitenturbulenz und Tag-Nacht-Rhythmus. Bei Populationen im Süden dagegen sind es Mondlicht und Tag-Nacht-Rhythmus. Dazu kommen nicht-oszillierende Zeitmeßsysteme, wie zum Beispiel Turbulenz länger als 6 Stunden. Arktische Rassen besitzen einen Sanduhr-Mechanismus. Sie messen die Temperaturdifferenz.

#### 11.3 Monatsrhythmen

Bei einigen Insekten sind Monatsrhythmen der Aktivität und des Schlüpfens von Adulttieren im Freiland beobachtet worden. Eine Eintagsfliege *Povilla adusta* schlüpft in großer Zahl vom Viktoriasee in den Tagen kurz vor und nach Vollmond, besonders am zweiten Tag nach Vollmond (Abbildung 11.16). Die Adulttiere leben nur eineinhalb Stunden. Deshalb müssen die Tiere sehr synchron schlüpfen. Sie tun das in der Zeit, in der die kurze Dämmerung durch den Vollmond verlängert wird. In dieser Zeit findet der Hochzeitsflug statt und die Kopulation. Auch im Labor wird dieser Rhythmus beibehalten; er ist also endogen.

Der Trichterbau des Ameisenlöwen Myrmeleon obscurus (Neuroptera) erfolgt ebenfalls im Monatsrhythmus (Abbildung 11.17). Die Flugaktivität von Bienen aus Marokko zeigen einen Monatsrhythmus im Winter und einen 14-tägigen Rhythmus im Sommer (Abbildung 11.18). Das Sammeln von Pollen der nordamerikanischen solitären Biene Sphecodogastra texana während





Abbildung 11.16: *Povilla adusta* (Adulttiere: oben) schlüpft in großer Zahl vom Viktoriasee kurz nach Vollmond. Es handelt sich dabei um einen Monatsrhythmus mit einer Periodenlänge von etwa 30 Tagen. Nach Corbet and et al. (1974). 131A und D131A1





der Abenddämmerung wird in die Nacht hinein ausgedehnt, wenn während dieser Zeit der Mond scheint (Kerfoot (1967)). Es ist nicht bekannt, ob es sich dabei um einen endogenen lunaren Rhythmus handelt.





E132b und D131b

Abbildung 11.18: Die Flugaktivität von Bienen aus Marokko zeigen einen Monatsrhythmus im Winter und einen 14-tägigen Rhythmus im Sommer. Nach Oehmke (1973). 131C1 und D131C/monatsrhythmen

Weitere Beispiele sind der Polychät Typosyllis prolifera und der Palolowurm Eunice viridis der Palolo- Samoa- und Fidschi-Inseln. Eunice viridis lebt in Korallenriffs. Bei ihr werden die Hinterteile des Wurm-förmigen Körpers mit den Geschlechtsprodukten ('Epitok') abgeschnürt und gelangen an die Oberfläche des Meeres. Dort findet die Befruchtung statt (Abbildung 11.19 und 11.20). Das passiert in der Nacht sieben Tage nach Vollmond im Oktober/November jeden Jahres (Abbildung 11.20). Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Befruchtung kommt, stark erhöht (Hauenschild et al. (1968), Caspers (1951), Caspers (1984)).



Abbildung 11.19: Palolowürmer leben in Korallenriffen der Palolo-, Samoa- und Fidschi-Inseln. Die Geschlechtsprodukte werden in der siebten Nacht nach Vollmond im Oktober/November jeden Jahres abgegeben und schwimmen zur Meeresoberfläche. Die Einwohner der Inseln fangen sie während dieser Nächte als Delikatesse. Aus Caspers (1951). 132a1/palolo

Beim Guppy schwankt die Farblichtempfindlichkeit auf gelb und violett um eine Zehnerpotenz im Laufe eines Monats (Lang (1970)). Der Zeitgeber ist bisher unbekannt. Luftdruckunterschiede und Luftelektrizitätsschwankungen wurden ausgeschlossen. Mikrovibrationen, Schwankungen der Schwerkraft und der Erdkruste könnten in Frage kommen.

Ein Buch von Palmer (1995) gibt eine gute Übersicht über die Gezeitenrhythmen, Rhythmen mit vierzehntägigen Perioden und Monatsrhythmen. Siehe auch die Bücher von Endres and Schad (1997) und Pearse (1990).



Abbildung 11.20: Links: Palolowurm Eunice viridis (nach Palmer (1974)). Oben das 'atoke' Vorderteil, darunter das 'epitoke' Hinterteil des wurmförmigen Körpers. Rechts: Nahaufnahme des Übergangs zwischen Vorderteil (oben) und Hinterteil (unten). Geschlechtsprodukte (hier: Spermien) des Epitok werden abgegeben und schwimmen zur Meeresoberfläche. Dort findet die Befruchtung statt. Ventralstrang läuft als graues Band durch die Mittellinie des Körpers; auf seiner Oberfläche Ventralaugen als dunkle Punkte (3); Chromophore (5). Rechte Abbildung nach Hauenschild et al. (1968). 13201 und 132 b/palolo

## Kapitel 12

# Jahresrhythmen

Jahresrhythmen helfen Organismen, sich an die verschiedenen Bedingungen des Jahres anzupassen und sich rechtzeitig auf wichtige Änderungen der Umweltbedingungen während des Jahres einzustellen. In diesem Kapitel werden einige Beispiele für Jahresrhythmen bei Organismen vorgestellt (Samenkeimung bei Pflanzen, Wachstumsringe, Schlüpfen aus Zysten bei Algen, Diapause und Verpuppung eines Käfers, Körpergewicht, Gewicht der Gonaden, Fellfärbung und Torpor bei Nagern, Mauser, Vogelzug und Zugunruhe bei Vögeln, Winterschlaf bei Säugern). Danach werden die Eigenschaften von Jahresrhythmen aufgelistet. Wie Jahresrhythmen durch Zeitgeber synchronisiert werden und experimentell beeinflusst werden können, wird in einem weiteren Abschnitt gezeigt. So weit bekannt, werden die physiologischen Grundlagen der Jahresrhythmen behandelt. Modelle für Jahresrhythmen werden vorgestellt. Es wird diskutiert, ob vielleicht mehr als eine Jahresuhr in einem Orqanismus zu finden ist. Jahresrhythmen sind genetisch fixiert. Das wird am Beispiel eng verwandter Zugvögel illustriert. Die adaptive Bedeutung und die Verwendung von Jahresrhythmen wird behandelt.

Die klimatischen Bedingungen der gemäßigten und höheren Breiten der Erde schwanken im Laufe des Jahres zum Teil drastisch. Die Temperaturen liegen im Winter oft weit unter dem Gefrierpunkt. Schnee und Eis hindern viele Tiere, an Nahrung zu kommen. Sie müssen dann ihren Stoffwechsel drosseln oder andere Strategien anwenden, um zu überleben. Insekten können die ungünstigen Bedingungen in besonderen Ruhestadien überdauern. Bei vielen Pflanzen müssen die oberirdischen Organe welken, da sie Frost nicht überstehen. In allen diesen Fällen ist es wichtig, dass die Organismen ihre Entwicklung auf die Jahreszeiten abstimmen. Sie müssen dazu feststellen können, welche Jahreszeit gerade herrscht, um sich früh genug zum Beispiel auf den nahenden Winter einzustellen. Sehr oft wird das erreicht, indem die Tageslänge gemessen wird (siehe Seite 237). Die Tageslänge ändert sich ja regelhaft mit der Jahreszeit: Sommertage haben lange Licht, im Winter sind die Lichtperioden kurz.

Aber auch eine innere Jahresuhr kann dazu dienen, die Entwicklung und das Verhalten eines Organismus auf die Jahreszeit einzustellen. Bei Pflanzen kann zum Beispiel solch eine Jahresuhr das Keimen der Samen nach einer Zeit der Samenruhe steuern. Dass es sich dabei tatsächlich um eine Jahresuhr handelt, zeigt sich, wenn die Samen unter konstanten Bedingungen gehalten werden. Auch dann keimen sie im Jahresrhythmus.

So, wie circadiane Rhythmen durch Zeitgeber, vor allem dem Licht-Dunkel-Wechsel, auf 24 Stunden synchronisiert werden, müssen auch Jahresuhren auf die Jahreszeit synchronisiert werden. Dazu benutzen viele Organismen die Dauer der Lichtperiode oder der Dunkelperiode (Photoperiode).

Jahresrhythmen dienen als Puffersystem zwischen Umwelt und der Physiologie des Organismus, schützen ihn gegen Umwelt-Störungen wie zum Beispiel dem Wetter und bügeln als träge Elemente kurzzeitige Schwankungen aus. Ultimate und proximate Faktoren spielen bei der Kontrolle von Jahresrhythmen eine Rolle. Ultimate Faktoren wirken direkt in Form von günstigen oder ungünstigen Bedingungen wie beispielsweise Nahrungsangebot, Nistmöglichkeiten. Proximate Faktoren sind dagegen verlässliche, voraussagende Faktoren wie beispielsweise die Photoperiode.

Jahresrhythmen bei Organismen sind in einem Buch ausführlich behandelt (Gwinner (1986)).

Neben Jahresrhythmen wird die Entwicklung von Pflanzen und Tieren auch durch noch langsamere periodische Vorgänge gesteuert, über deren Natur kaum etwas bekannt ist. So gibt es Bambusarten, die nur alle 15 oder 45 Jahre blühen und danach eingehen (wie es 1997/98 in vielen europäischen Gärten geschah!).

## 12.1 Beispiele für Jahresrhythmen bei Pflanzen

Jahresrhythmen sind bei Pflanzen weit verbreitet. Sie sind im Keimen mancher Samen zu beobachten, bei der Stecklingsbewurzelung von Weiden, im Wachsen von *Lemna* und *Avena*, im Laubwechsel (in Gebieten, in denen Regen und Trockenzeit regelmäßig abwechseln, beginnt der Laubwechsel einen Monat vor dem Regen (Bünning (1951)), beim Holzzuwachs, der sich in Jahresringen äußert, im Laubfall, in der Frosthärte, der Knospenruhe. Photoperiodische Kontrolle solcher und anderer Vorgänge werden in einem anderen Abschnitt behandelt (siehe Seite 237).

#### 12.1.1 Samenruhe und Samenkeimung

Die Entwicklung der Pflanzen muß in den gemäßigten und höheren Breiten mit der Jahreszeit synchronisiert sein. Das gilt auch für die Samenruhe und Samenkeimung und ihre Einpassung in die Jahreszeit. Der Entwicklungsgang einer Samenpflanze ist in Abbildung 12.1 dargestellt. Nach der Befruchtung bildet sich aus der Samenanlage ein Samen mit Embryo und Nährgewebe. Der Embryo im Samen einer Pflanze enthält bereits alle Gewebe der vegetativen Pflanze. Bevor er sich aber weiterentwickelt, geht er in eine Ruheperiode über. In dieser 'Dormanz' überdauern die Samen ungünstige Bedingungen wie zum Beispiel die tiefen Temperaturen des Winters (siehe Taylorson and Hendricks (1977)).

Was passiert bei der Samenkeimung? Bei vielen Pflanzen keimen die Samen, wenn Wasser zur Verfügung steht und dadurch Gasaustausch möglich wird. Bei anderen dagegen sind photoperiodische Signale oder niedrige Temperatur (Vernalisation) nötig, um den Entwicklungsstop zu beenden. In wiederum anderen Fällen wird die Samenruhe durch einen endogenen Jahresrhythmus kontrolliert. Für mehr Informationen zur Samenkeimung siehe Hegarty (1978) und Theimer (n.d.).



Abbildung 12.1: Entwicklungsgang einer Samenpflanze: Embryobildung, Samenreifung, Samenruhe, Samenkeimung, Keimlingsentwicklung, Entwicklung der Pflanze, Blütenbildung, Befruchtung. E136/entwicklung-samenpflanze

Endogener Jahresrhythmus der Samenkeimung Die Samenkeimung kann endogen jahresperiodisch schwanken. Von Bünning und Mitarbeitern wurden in den Jahren zwischen 1940 und 1960 Samen von 335 Pflanzenarten bei verschiedenen Lagertemperaturen (2, 20 und  $35^{0}$ C) im Dauerdunkel und Dauerlicht gehalten und die Keimfähigkeit im Laufe des Jahres geprüft (Bünning (1951)). Von diesen zeigten 10 einen besonders deutlichen Jahresrhythmus: Die maximale Keimfähigkeit erfolgte für eine bestimmte Art immer zur gleichen Jahreszeit. Zu diesen Pflanzen gehört Hypericum, Digitalis lutea (Abbildung 12.2), Potentilla molissima, Gratiola officinalis, Chrysanthemum corymbosum, Viscum album, Fragaria vesca.

Die Lagertemperatur, Wasserentzug, Sauerstoff-, Stickstoff- und  $CO_2$  Gehalt der Luft hatten keinen Einfluß auf den Rhythmus. Das gleiche galt für Hitzebehandlung. Wurde diese allerdings kurz vor der Keimprobe gegeben (110<sup>0</sup>), ergab sich ein Jahresrhythmus der Resistenz (und eine hohe Mortalität). Werden die Samen unter Stickstoff gehalten, ist die Keimfähigkeit zwar verringert, aber der Jahresrhythmus bleibt erhalten. Unter Sauerstoff ge-



Abbildung 12.2: Jahresrhythmus der Samenkeimung von *Digitalis lutea*. Die Samen wurden bei  $3^{0}$ C gelagert und etwa alle 45 Tage auf feuchtes Filterpapier bei  $23^{0}$ C im Dauerlicht gebracht. Aufgetragen ist der Prozentsatz keimender Samen zu den verschiedenen Jahreszeiten. Nach Bünning (1949). D137/jrsamenkeimung

halten ist die Keimfähigkeit erhöht und auch hier findet man einen Jahresrhythmus.

In trockenem Samen läßt sich ein endogener Jahresrhythmus der Atmung demonstrieren. Er verläuft parallel zu einem Jahresrhythmus der Wasserpermeabilität und Quellbarkeit. Die physiologischen Ursachen dieses Jahresrhythmus sind unbekannt (Abbildung 12.3). Spruyt und Mitarbeiter untersuchten die Wasseraufnahme von Bohnensamen (Abbildung 12.5, Spruyt and De Greef (1987), Spruyt et al. (1983)). Dazu wurden die Samen für 4 Stunden in Wasser gelegt und danach das Gewicht bestimmt. Die Keimung korrelierte mit der Wasseraufnahme. Sowohl die Wasseraufnahme als auch die Wurzellänge und das Gewicht schwankten jahresrhythmisch mit einer Periodenlänge von 10 bis 11 Monaten (Abbildung 12.4). Während der Samenruhe ist die Streckungsbereitschaft des Embryos gehemmt ( Lapeyronie (1968)).



Abbildung 12.5: Jahresperiodische Schwankungen der Wasseraufnahme (in Prozent des Trockengewichtes) trockener Bohnensamen (*Phaseolus vulgaris*) in vier Stunden bei  $25^{0}$ C im Dunkeln von Juni 1984 bis Juli 1986. Nach Spruyt and De Greef (1987). 140/jrwasseraufnahme-bohne

Bei *Fragaria* beeinflussen die Mutterpflanzen die Keimbereitschaft: Samen, der zu verschiedenen Zeiten gereift war, wurde geerntet und die Keimbereitschaft in den folgenden Monaten gemessen: Sie war unabhängig vom Erntezeitpunkt bei allen Proben im Oktober am höchsten (Abbildung 12.6). Was den Jahresrhythmus der Samenkeimung synchronisiert, ist unbekannt.



Abbildung 12.6: Keimbereitschaft des Samens von *Fragaria vesca*, der zu verschiedenen Zeiten gereift war, ist unabhängig vom Erntezeitpunkt (verschiedenfarbige Pfeile) bei allen Proben (verschiedene Kurven) im Oktober am höchsten (Bünning (1949)). D139/ jr-erdbeere

Die Rolle photoperiodischer Reaktionen bei Samenruhe und Samenkeimung wird später besprochen (siehe Abschnitt 13.2.4).

## 12.2 Jahresrhythmen bei Algen

Jahresrhythmen sind auch bei einer ganzen Reihe von Algen beschrieben worden Zwei Beispiele sollen vorgestellt werden, das jahresrhythmische Wachstum der Phylloide von Laminaria und das Schlüpfen der Diatomee Gonyaulax tamarense aus ihren Zysten im Frühjahr.



Abbildung 12.3: Jahresrhythmus der Substanzproduktion (Ordinate, mg Trockengewicht in 30 Tagen) bei *Lemna* in den Jahren 1963 bis 1995. Nach Bornkamm (1966). E138/jr-samenatmung



Abbildung 12.4: Jahresrhythmus der Radicula-Länge (blau) und des Radicula-Gewichtes (grün) bei Bohnenkeimlingen. Nach Spruyt and De Greef (1987). D138A/jr-radicle



Abbildung 12.7: *Pterygophora californica* Sporophyt (oben) mit Rhizoid (rechts), Cauloid (Stengel-artig) und einem Phylloid (links). Die Phylloide wachsen hauptsächlich im Winter und bilden an der Basis ein neues Blatt aus Reserven des alten. Der Jahresrhythmus dieses Wachstums ist in dem unteren Teil gezeigt. 1 (oben) ist das älteste (erster Wachstumsschub in der Kurve), 3 das jüngste (dritter Wachstumsschub in der Kurve). Nach Lüning (1990). E141/jr-laminaria

#### 12.2.1 Jahresrhythmus des Phylloidwachstums von Laminarien

Laminariales sind große Braunalgen (Phaeophyceen) des Meeres. Ihre Sporophyten bestehen aus einem Rhizoid, einem Cauloid und einem Phylloid. Sie besitzen eine Art Laubwechsel und wachsen hauptsächlich im Winter. Die Algen bilden im Winter (und im Dauerdunkel) ein neues Blatt aus Reserven des alten (Lüning (1970)). Die Phylloide von Laminaria hyperborea, digitata und Pterygophora californica wachsen im Jahresrhythmus (Abbildung 12.7 und Schaffelke and Luening (1994), Lüning (1991)). Dieser Rhythmus wurde auch in Kulturen gefunden, die in einem Tank mit konstanter Tageslänge und Temperatur gehalten wurden. Auch die Nährstoffversorgung war gleichmässig. Die Periodenlänge dieses Jahresrhythmus beträgt bei Laminaria hyperborea 33 bis 40 Wochen (12 Stunden Licht pro Tag),

bei *L. digitata* 27 bis 34 Wochen (8 Stunden Licht pro Tag), ist also kürzer als ein Jahr. Der Jahresrhythmus zeigt sich nur, wenn die Algen dauernd im Langtag (kritische Tageslänge 8-9h) gehalten werden. Im Kurztag gibt es keinen solchen Rhythmus, wohl aber im Kurztag mit Störlicht in der Mitte der Dunkelperiode<sup>1</sup> (es ist bekannt, daß Kurztag mit Störlicht bei photoperiodischen Reaktionen wie Langtag wirkt).

Das Phylloidwachstum läßt sich durch sinusförmig oder rechteckförmig modulierte Tageslängen mit 12 monatiger Periode synchronisieren, aber auch durch 6- und sogar 3-monatige Zyklen (Abbildung 12.8 und Lüning (1990)). Der Jahresrhythmus hat also einen großen Ziehbereich, wie es auch von anderen Objekten mit Jahresrhythmus bekannt ist. Langtag mit Lichtperioden über 8 Stunden Dauer synchro-

 $<sup>^1\</sup>mathrm{Dann}$  ist die Periodenlänge allerdings nur noch 20 bis 26 Wochen.



Abbildung 12.8: Synchronisation der Wachstumsrate der End-Phylloide von *Pterygophora californica* durch sinusförmig modulierte Tageslängen (12, 6, 3 Monats-Zyklen). Simuliert wurde der Jahresgang der Tageslänge in 54<sup>0</sup> N Breite. Temperatur 5<sup>0</sup>C. Nach Lüning (1990). D142/mnbjr-laminaria

nisieren den circannualen Rhythmus auf das natürliche Jahr. Auch bei Agarum cribrosum, Pleurophycus gardneri, Laminaria saccharina, L. bongardiana und Desmarestia aculeata kann das Wachstum durch künstliche Tageslängen synchronisiert werden. Aber bei diesen Algen ist bisher noch kein circannualer Wachstumsrhythmus nachgewiesen worden.

#### 12.2.2 Meeresalge mit innerem Kalender

Die Panzeralge Gonyaulax tamarense besitzt einen Jahresrhythmus. Eine verwandte Alge hatten wir bereits kennengelernt, als wir die circadiane Steuerung der Biolumineszenz besprochen haben (Seite 97). Bei Gonyaulax tamarense schlüpfen die Algen im Frühjahr aus einer Zyste. Der Vorgang wurde genauer untersucht (Anderson and Keafer (1987)):

Die Art ist in den Küstengewässern der Meere gefürchtet: Sie bildet Algenblüten, durch die Fischvergiftungen entstehen können. Der Fischfang muß dann eingestellt werden. Im Golf von Main an der Ostküste der Vereinigten Staaten kommen solche Episoden zwischen April und November vor. In dieser Zeit sind die Zellen vegetativ und bewegen sich mit zwei Geißeln. Im Winter sinken sie auf den Meeresboden, werfen Gehäuse und Geißeln ab und bildet Zysten, in denen sie für 2 bis 6 Monate überwintern (Dormanz). Im Frühjahr schlüpfen die Algen aus ihren Zysten, bilden wieder eine Hülle aus und gelangen mit Hilfe ihrer Geißelnn an die Oberfläche des Meeres.

Das Schlüpfen aus der Zyste wird durch einen Jahresrhythmus kontrolliert: Werden Proben der Algen aus dem Meeres-Sediment zu verschiedenen Jahreszeiten in einen 14:10 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel gebracht und bei  $15^{0}$ C im Labor gehalten, schlüpfen Algen wie in Abbildung 12.9 gezeigt in einem Jahresrhythmus.

Er zeigt sich auch, wenn eine im August gesammelte größere Probe in einem Kühlschrank bei  $2^{0}$ C gehalten wird und einzelne Proben davon zu verschiedenen Jahreszeiten in  $15^{0}$ C gebracht werden (Abbildung 12.9). Da die Oszillation über zwei Jahre verfolgt wurde, handelt es sich um einen echten endogenen Jahresrhythmus. Algenpopulationen in flachem Küstenwasser zeigen diesen endogenen Jahresrhythmus nicht. Diese Algen erhalten vielleicht jahresperiodische Informationen und benötigen deshalb keinen endogenen Rhythmus.

Jahresrhythmen sind auch bei anderen Dinoflagellaten bekannt und von ökologischer Bedeutung (C and et al. (1990)).

## 12.3 Weitere Beispiele für Jahresrhythmen bei Pflanzen

Weitere Jahresrhythmen wurden bei Pflanzen beobachtet (bei einigen von ihnen wurde der endogene Charakter noch nicht nachgewiesen).

- Die Nitratreduktion bei Ankistrodesmus braunii im Dauerlicht bei 23<sup>0</sup>C (Kessler and Cygan (1963)),
- die Entwicklung bei Laubmoosen (Jendralski (1955)),
- Trockengewicht, Proteingehalt, und Kohlehydratgehalt bei *Lemna minor* (Bornkamm (1966)),
- perenniale Organe bei Wasserpflanzen (Henssen '54) (Henssen (1954)).
- Salix-Stecklinge bewurzeln sich unterschiedlich gut im Laufe eines Jahres, wenn sie mit IES (0.01 bis 0.001%) behandelt werden (Abbildung 12.10). Bei *Populus* gibt es zwei Gipfel pro Jahr (Gumpelmayer (1949)).



Abbildung 12.9: Gonyaulax tamarensis vom Golf von Main schlüpfen im Jahresrhythmus aus den Zysten. Oben: Prozentsatz der Keimung von Zysten in Proben vom Meeresboden. Unten: Eine größere Probe vom Meeresboden wurde bei  $4^{0}$ C im Kühlraum gehalten. Proben davon wurden zu verschiedenen Zeiten innerhalb von zwei Jahren in  $18^{0}$ C überführt. Der Prozentsatz keimender Zysten ist als Funktion der Jahreszeit aufgetragen. Nach Anderson and Keafer (1987). D143/jr-gonyaulax

- Die Keimung und Blattbewegung von Oxalis regnellii und Oxalis acetosella (beides Schattenpflanzen) schwankt jahresperiodisch (Müller-Haeckel (1975)). Es zeigte sich ein endogener Jahresrhythmus mit einer Periodenlänge von 13 Monaten (Kumke (n.d.)).
- Der Längenzuwachs von Primärblättern bei Keimlingen von Avena sativa schwankt jahresperiodisch (Linser (1950)).
- Das Sproß- und Wurzelsystem von Symphytum officinale entwickelt sich jahresperiodisch unterschiedlich. Kohlehydrat-Gehalt und Menge der Fruktosane schwanken jahresperiodisch (Staesche (1966)).
- Die Produktions-Kapazität von Gras schwankt jahresperiodisch (Rappe (1964)).
- Ein Jahresrhythmus der Zeit bis zum Blühen wurde bei Weizen beobachtet (Johansson et al. (1996)). Bei allen Frühjahrssorten blühten früh im Jahr keimende Pflanzen. Das Verhalten war unabhängig vom Jahr der Ernte und dem Alter der Samen, dem Anzuchtort, der Stickstoffversorgung. Wahrscheinlich handelt es sich beim Blühen des Frühjahrsweizens um einen endogenen Jahresrhythmus. Bei Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeiten im Jahr sollte darauf geachtet werden.
- Jahresperiodische Knospenruhe (Howe et al. (1996), Cottignies (1993)).
- Die Stomatabewegung bei Bohnen schwankt jahresrhythmisch. Bei diesen Versuchen wurde die Luft gefiltert, um zu vermeiden, daß chemische Signale, die sich jahreszeitlich ändern, den Jahresrhythmus bewirken (Seidman 1968) (Abbildung 12.11, Seidman and Riggan (1968)).



Abbildung 12.10: *Salix*-Stecklinge bewurzeln sich unterschiedlich gut im Laufe eines Jahres, wenn sie mit IES (0.01 bis 0.001%) behandelt werden. Nach Gumpelmayer (1949). D144/jrsalix

## 12.4 Jahresrhythmen bei Tieren

Im vorausgegangenen Abschnitt hatten wir einige Jahresrhythmen bei Algen und Pflanzen kennengelernt. Jahresrhythmen kommen auch bei Tieren vor. Besonders gut sind sie bei Vögeln und Säugern untersucht (Aschoff (1955), Gwinner (1986)). Dazu gehören beispielsweise reproduktive Aktivität, Körpergewicht, Felloder Federwechsel, Vogelzug. Auch der Winterschlaf als Überlebensstrategie einiger Säuger wird jahresperiodisch gesteuert (siehe Abschnitt 12.4.4).

Der Wechsel zwischen den Jahreszeiten ist viel drastischer als der im Laufe eines Tages. Deshalb werden die physiologischen Zustände und Verhaltensweisen der Tiere auch viel tiefgreifender durch Jahresrhythmen als durch Tagesrhythmen geändert.

Wir werden in den folgenden Abschnitten ein Beispiel für Jahresrhythmen bei Invertebraten, nämlich dem Wollkrautblütenkäfer Anthrenus



Abbildung 12.11: Jahresperiodische Schwankung der Stomataweite bei Bohnen im Gewächshaus (gestrichelte Kurve) und in einer Klimakammer (durchgezogene Kurve). Im Gewächshaus ändern sich Luftdruck, Lichtintensität, Temperatur und relative Luftfeuchte im Laufe des Tages und Jahres. In der Klimakammer wurden Temperatur, Lichtintensität und Photoperiode (16:8 Licht-Dunkel-Wechsel) konstant gehalten. Die Luft wurde mit Kohlefilter gereinigt. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration war geringer als 1ppm. Nach Seidman and Riggan (1968). D147/jr-bohne-stomata

*verbasci* und drei Beispiele von Jahresrhythmen bei Vertebraten kennenlernen.

- 1. Die Jahresrhythmen des dsungarischen Hamsters (Fortpflanzung, Körpergewicht, Hodengewicht, Fellfärbung) an.
- 2. Die jahresperiodischen Änderungen bei Vögeln (Vogezug, Körpergewicht, Aktivität, Mauser und Fortpflanzung)
- 3. Jahresperiodische Steuerung des Winterschlafs bei Säugern.

#### 12.4.1 Jahresrhythmen bei Invertebraten

Viele Eigenschaften, Verhaltensweisen, physiologische Vorgänge und Entwicklungsschritte von Insekten schwanken im Laufe eines Jahres. Nur unter konstanten Bedingungen lässt sich jedoch feststellen, ob es sich dabei um circannuale Rhythmen handelt.

Bei Insekten sind nach diesen Kriterien bisher nur wenige Fälle echter Jahresrhythmen beobachtet worden. Dazu gehört der Wollkrautblütenkäfer Anthrenus verbasci (Dermestidae). Oft werden von diesem Käfer wertvolle zoologische Sammlungen zerstört. Es ist ein langlebiges Insekt, welches den ersten und zweiten Winter als Larve in einem Diapausezustand verbringt (zur Diapause siehe Unterabschnitt 13.3). Danach verpuppen sich die Larven. Im folgenden Frühjahr schlüpfen die Adulttiere. In einer Population, die im Dauerdunkel gehalten wird, beobachtete Blake (1959) einen Jahresrhythmus der Diapause und Verpuppung (Abbildung 12.12). Bei Temperaturen über  $20^{0}$ C sind alle Tiere der Population bereits in einem Jahr geschlüpft. Man kann also keine Periodenlänge des Jahresrhythmus bestimmen. Bei  $17.5^{0}$ C und  $20^{0}$ C ist das Schlüpfen über zwei Jahre verteilt. Die Periodenlänge liegt zwischen 10 und 11 Monaten. Der Jahresrhythmus erlaubt also nur zu bestimmten Zeiten des Jahres das Schlüpfen. Tiere, die in diesem Zeitraum noch nicht weit genug entwickelt waren, müssen bis zum nächsten erlaubten Schlüpfzeitraum ein Jahr später warten.

Vor kurzem wurde der Jahresrhythmus des Wollkrautblütenkäfer neu und ausführlicher an einer japanischen Population untersucht (Nisimura and Numata (2001)). Die Temperaturkompensation wurde bestätigt. Es wurde gezeigt, daß der Übergang von Langtag-Bedingungen in Kurztag Zeitgeber des Jahrerhythmus ist.



Abbildung 12.12: Jahresrhythmus der Diapause und Verpuppung des Wollkrautblütenkäfers Anthrenus verbasci (Dermestidae), einem Schädling zoologischer Sammlungen. Im Dauerdunkel, konstanter Temperatur von  $20^0$ und  $17.5^0$ C und konstanter Luftfeuchte verpuppen sich einige Larven im ersten, andere erst im zweiten Zeitfenster. Die Abstände dieser Verpuppungszeiten betragen 10 bis 11 Monate. Es handelt sich also um einen endogenen Jahresrhythmus. Nach Blake (1959). D148/Anthrenus-jr Die Schnecke *Limax flavus* wurde unter konstanten Temperaturen ( $20^0$  beziehungsweise  $10^0$  C) und konstanter Feuchtigkeit (40 - 60%) gehalten. Sie legt ihre Eier in einem circannualen Rhythmus ab, wie Abbildung 12.13 zeigt.



Abbildung 12.13: *Limax flavus* legt unter konstanten Temperaturen von  $20^0$  und  $10^0$ C und bei einer relativen Luftfeuchte von 40 - 60%ihre Eier in einem circannualen Rhythmus ab. Nach Segal (1960). D149/limax-jr

#### 12.4.2 Jahresrhythmus des dsungarischen Hamsters

Von verschiedenen Säugern sind Jahresrhythmen bekannt. Das Goldmantel-Erdhörnchen Spermophilus lateralis gehört dazu (Pengelley and Asmundson (1974)), (Pengelley), das Eichhörnchen Tamiasciurus hudsonicus (Becker (1993)), Fledermäuse (Daan (1973)), Schafe (Jahresrhythmus des Wollwachstums, (Reis (1992)), Rektaltemperatur von Corriedale-Schafen unter tropischen Bedingungen (Dasilva and Minomo (1995)), Resusaffen und weitere Säuger (siehe Tabelle 2.1 in Gwinner (1986)).

Beim dsungarischen Hamster (*Phodopus sungorus*) sind die jahreszeitlichen Änderungen der Umweltfaktoren ganz besonders extrem. Die Lufttemperaturen können in seinem natürlichen Lebensraum im Sommer auf  $45^{0}$ C



Abbildung 12.14: Dsungarischer Hamster (*Phodopus sungorus*) im Sommer- und Winterkleid. Nach Figala et al. (1973). 161/Phodopus

steigen und im Winter bis auf  $-64^{0}$ C fallen. Es ist deshalb verständlich, daß die Tiere sich physiologisch, morphologisch und in ihrem Verhalten auf diese Änderungen im Jahresgang einstellen müssen. Ihr Körpergewicht, Hodengewicht und ihre Fellfärbung (Abbildung 12.14) schwanken unter anderem jahresperiodisch (Abbildung 12.15 und Hoffmann (1978)). Durch einen Jahresrhythmus wird die Fortpflanzung der Tiere auf eine bestimmte Jahreszeit beschränkt, zu der die Überlebenschancen der Jungen günstig sind.

Auch beim Goldhamster (Gorman and Zucker (1997)) und europäischen Hamster (Masson-Pevet et al. (1994)) wird die Fortpflanzung nicht nur photoperiodisch gesteuert, sondern unterliegt einem circannualen Rhythmus. Beim Dsungarischen Hamster ist die jahreszeitliche Komponente aber viel ausgeprägter. Die Photoperiode wird vom Muttertier wahrgenommen und Signale an den Fötus weitergegeben (Reppert (1995)). Sie bestimmen das Reproduktionsmuster des erwachsenen Tieres.

Sowohl die photoperiodische Steuerung als auch die Jahresperiodik dienen dazu, die reproduktiven und nichtreproduktiven Perioden an die Jahreszeit mit den günstigsten Lebensbedingungen anzupassen. Ein endogener Jahresrhythmus würde allein nicht ausreichen, die



Abbildung 12.15: Jahresrhythmus beim dsungarischen Hamster *Phodopus sungorus*. Im Spätsommer und Herbst sinken Körpergewicht (oben, rot) und die Gonaden bilden sich zurück (*Regression*, unten). Nachdem die Tiere einige Zeit im Kurztag waren, wird die Regression beendet: Die Gonaden entwickeln sich wieder, das Körpergewicht nimmt zu (*Recrudeszenz*). Nach A31 (n.d.). D162/phodopus-zyklus

nötigen physiologischen Vorgänge genügend genau auf eine bestimmte eng begrenzte Zeit festzulegen. Durch eine zusätzliche photoperiodische Kontrolle wird der endogene Jahresrhythmus mit dem Jahresrhythmus der Umwelt synchronisiert. Auf diese Weise wird zum Beispiel beim Dsungarischen Hamster erreicht, daß alle Männchen zur gleichen Zeit Spermien entwickeln und kurz danach alle Weibchen ihren Östrus haben. Damit wird die Fortpflanzung der Tiere gut abgesichert.

#### 12.4.3 Jahresrhythmen bei Vögeln

Jahresrhythmen sind besonders gut an Vögeln untersucht worden. Bei ihnen sind es vor allem Vorgänge, die mit dem Zug in die Winterquartiere und in die Sommerquartiere und mit dem Fortpflanzungs-Verhalten verbunden sind wie Federkleidwechsel (Mauser), Körpergewicht und Nahrungspräferenz, Gonadenwachstum und Zugverhalten.

Jährlich ziehen etwa 600 Millionen Vögel zu ihren Brutgebieten oder in die Winterquartiere. Die Wanderung beträgt jedes Jahr zum Teil viele Monate (bis zu neun), während die Brutzeit kurz sein kann (ein Monat). Deshalb ist ein genauer Fahrplan nötig. Dieser Fahrplan liegt als endogenes Zeitprogramm vor. Es ist genetisch fixiert. Kurzstreckenzieher können flexibler sein. Bei ihnen variieren deshalb Abflug und Ankunftszeiten stärker. Neun Monate wandern sie, einen Monat brauchen sie für die Brut.

Wie genau solche Jahresrhythmen funktionieren können, zeigt sich bei den sogenannten 'Kalendervögeln', die innerhalb weniger Tage des Jahres aus ihren Winterquartieren in unseren Breitengraden ankommen. Der Wasserläufer zum Beispiel erscheint in Helsinki zwischen dem ersten und achten Mai  $(4.5 \pm 2.06 \text{ Tage})$ , die nördliche Mauerschwalbe *Pterochelidon al*- *bifrons albifrons* erreicht San Juan Capistrano, California, um den 19. März (Abbildung 12.16).

Bei tropischen Formen und transäquatorialen Zugvögeln sind Jahresrhythmen sinnvoll, weil die Unterschiede der Tageslänge in den Äquator-nahen Gebieten zu gering sind, um über photoperiodische Signale die Zugzeiten festzulegen.

Die Synchronisation mit der Umwelt geschieht über ein Gummibandsystem aus innerer Jahresuhr und Zeitgebern aus der Umwelt wie beispielsweise photoperiodischen Signalen, aber auch zusätzliche Feinregulatoren. Zusammen ergibt das auf der einen Seite eine hohe Flexibitität und Anpassungsfähigkeit, auf der anderen Seite einen hohen Zuverlässigkeitsgrad.

Vogelzug, Zugunruhe, Mauser: Den Trieb zum Wandern auf der Suche nach Nahrung haben viele Tiere. Sie ziehen im Winter aus dem Gebirge in Täler oder in der heißen Jahreszeit aus der Steppe in feuchtere Gebiete. Bei Vögeln sind diese Züge sehr viel ausgeprägter. Oft beginnt der Zug bereits, wenn Nahrung noch reichlich vorhanden ist (Pirol, Mauersegler). Vor dem Zug werden sie unruhig (Zugunruhe). Beim Vogelzug werden von Langstreckenziehern große Entfernungen zwischen den Winter- und Sommergebieten zurückgelegt. So zieht die Küstenseeschwalbe zwei mal im Jahr etwa 10 000 km. Die Rauchschwalbe zieht im Herbst nach Südafrika und im Frühjahr zurück. Auch kleine Vögel wie der Rubinkehlkolibri ziehen über weite Strecken. Dieser Vogel überquert den Golf von Mexiko. Er wiegt normalerweise nur 2g und legt vor dem Zug nochmals 2g an Gewicht zu. Während des Zuges orientieren sich viele Vögel nach Sonne und/oder Sternen (siehe Kapitel 10).

Erste Hinweise auf die jahresperiodische Kon-



Abbildung 12.16: Typischer jährlicher Brut- und Zug-Zyklus von Vögeln der gemäßigten Breiten. Oberer Teil zeigt die Reihenfolge der Ereignisse, der untere Teil die Aufenthaltszeiten im Sommer- und Winterquartier (x-Achse Monate). Bei Kalendervögeln wird die Ankunftszeit im Sommerterritorium auf einige wenige Tage eines bestimmten Monats beschränkt. Nach Beck (1963). 163y/kalendervogel

trolle des Vogelzuges gaben Beobachtungen am Grünlaubsänger (*Phylloscopus trochilus*, Gwinner (1968)). Er hält sich lange in äquatorialen Gebieten auf. Im März beginnt er in die höheren nördlichen Breiten zu ziehen, im späten Juli und August zieht er wieder in die äquatorialen Gebiete. Wie viele kleine Zugvögel zieht auch er nachts, obwohl er normalerweise ein Tag-aktiver Vogel ist. Wird er in Käfigen gehalten, entwickelt er zu dieser Zeit Zugunruhe (Abbildung 12.17).

Für den Zug werden eine Reihe von Vorbereitungen getroffen: Das Federkleid wird gewechselt (Mauser). Fett wird abgelagert. Dadurch steigt das Körpergewicht stark an. Zunächst wurde vermutet, daß diese Vorgänge durch die Tageslänge in Gang gesetzt werden. Die Unterschiede in der Tageslänge sind aber für Vögel, die in der Nähe des Äquators leben, sehr gering. Deshalb war es nicht so verwunderlich, daß diese Änderungen in der Physiologie und im Verhalten auch eintraten, wenn die Tiere für längere Zeit im Labor unter immer gleichen Tageslängen (12:12h Licht-Dunkel-Wechsel) gehalten wurden. Nach 28 Monaten Registrierung ergab sich für die nächtliche Aktivität eine Kurve, wie sie in Abbildung 12.18 dargestellt ist. Man erkennt einen circannualen Rhythmus von 10 Monaten (Gwinner (1967)). Auch ohne äußere Zeitgeber läuft also in den Tieren ein endogenes Jahresprogramm ab, das die Vorbereitungen zum Zug und den Zug selbst steuert. Da die 'Freilaufperiode' deutlich von der Länge eines Jahres abweicht (10 statt 12 Monate), muß es sich um einen endogenen Rhythmus handeln.

Ähnliche Untersuchungen wurden auch an Grasmücken durchgeführt. Abbildung 12.19 zeigt die Änderungen der Gonadengröße von Gartengrasmücken (Sylvia borin) im Verlauf von 33 Monaten bei konstanter Temperatur von  $20^{0}$ C und in einem konstanten Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 Stunden im Vergleich mit einer unter Naturtag gehaltenen Gruppe (Berthold et al. (1972)). Mönchsgrasmücken (Sylvia atricapilla) wurden sogar über 8 Jahre in einem Licht-Dunkel-Wechsel 10:14 gehalten (Berthold (1978)). Auch bei ihnen zeigte sich ein endogener Jahresrhythmus der



Abbildung 12.17: Ein Emlen-Käfig wird verwendet, um die Zugunruhe zu messen. Ein Stempelkissen in der Mitte färbt die Füße des Vogels. Bei Zugunruhe schwärzt er das Papier in der Vorzugsrichtung seines Hüpfens. Nach Emlen and Emlen (n.d.). E150/emlen-kaefig



Abbildung 12.18: Circannualer Rhythmus der nächtlichen Aktivität (Kurve) und der Mauser (Balken) eines Fitislaubsängers (*Phylloscopus trochilus*), der 28 Monate unter konstanter Temperatur und im 12:12 Licht-Dunkel-Wechsel gehalten wurde. Zahl der nächtlichen zehn Minuten-Intervalle mit Aktivität aufgetragen gegen die Jahreszeit (Monate). Nach Gwinner (1967). D151/Phylloscopus-jr



Abbildung 12.19: Jahresperiodische Änderungen des Körpergewichts, der Zugunruhe (dünne Balken) und der Mauser (dicke Balken) von Gartengrasmücken (*Sylvia borin*) im Verlauf von 33 Monaten bei konstanter Temperatur von 20<sup>0</sup>C. Eine Gruppe (grüne Kurve) wurde im Naturtag gehalten, eine zweite (rote Kurve) im 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel. Jeweils Januar markiert. Nach Berthold et al. (1972). D152/Sylvia-jr

Mauser. Die Periodenlänge betrug 10 Monate, sodaß in den acht Jahren neun endogene Jahre abliefen.

Circannuale Rhythmen der Gonaden wurden eingehend an Staren (Sturnus vulgaris) untersucht (Gwinner (1981)). In Abbildung 12.20 ist das Ergebnis eines Experimentes gezeigt, in dem Tiere für 43 Monate entweder in einem 12:12h Licht-Dunkel-Wechsel (oberer Teil der Abbildung) oder in einem 11:11h Licht-Dunkel-Wechsel (unterer Teil der Abbildung) gehalten wurden. In beiden Fällen schwankten die Hodengrößen und die Zeiten der Mauser endogen jahresperiodisch. Die verschiedenen Tageslängen (24 beziehungsweise 22 Stunden) spielten keine Rolle. Am Star wurde auch gezeigt, daß die Bedingungen, unter denen im Labor ein endogener Jahresrhythmus nachgewiesen werden kann, begrenzt sind: Weder im 11:13- noch im 13:11 Licht-Dunkel-Wechsel gibt es einen circannualen Rhythmus, wohl aber im 12:12 Licht-Dunkel-Wechsel (Abbildung 12.21).

Werden die Tiere aus einem 11:13 Licht-Dunkel-Wechsel in 12:12 Licht-Dunkel-Wechsel oder aus einem 13:11 Licht-Dunkel-Wechsel in 12:12 Licht-Dunkel-Wechsel überführt, beginnt die Gonadenentwicklung und die Mauser in einem bestimmten Abstand zum Übergang in 12:12 Licht-Dunkel-Wechsel. Das zeigt, daß die circannuale Uhr wirklich stand und nicht nur ihr Zeiger vom Uhrwerk entkoppelt war oder ein Maskiereffekt den Jahresrhythmus überlagerte. Ursache für die Arretierung des Jahresrhythmus im 11:13 Licht-Dunkel-Wechsel ist der Kurztag: Nur durch Langtag kann das Refraktärstadium wieder aufgehoben werden, das durch den Kurztag induziert wurde. Ursache für die Arretierung des Jahresrhythmus im 13:11 Licht-Dunkel-Wechsel ist der Langtag-Charakter: Die Tiere können nicht in das Refraktärstadium eintreten, weil das nur im Kurztag geht. Im 12:12 Licht-Dunkel-Wechsel ist jedoch beides möglich: Das Refraktärstadium



Abbildung 12.20: Circannualer Rhythmus der Gonadengröße (Kurve) und der Mauser (Balken) beim Star (*Sturnus vulgaris*). Das Tier wurde 43 Monate einzeln in einem 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Zyklus (obere Kurve, rot) oder in einem 11:11 stündigen Licht-Dunkel-Zyklus (untere Kurve, schwarz) gehalten. Nach Gwinner (1981). D153/Sturnus-jr



Abbildung 12.21: Schema des Jahresrhythmus eines Stares in verschiedenen Licht-Dunkel-Zyklen im 11:13-, 12:12- und 13:11 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel. Im Kurztag von 13:11 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel gibt es keinen Jahresrhythmus, weil das Refraktärstadium nur durch Langtag aufgehoben werden kann. Im 13:11 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel wird der Jahresrhythmus arretiert, weil dieser Langtag verhindert, daß die Tiere refraktär werden. Im 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel dagegen ist beides möglich: Induktion und Beendigung des Refraktärstadiums. Werden die Tiere aus einem 11:13 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel in 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel (zu zwei Zeiten: Beginn rote Kurven, mit Beschriftung, oben rechts) oder aus einem 13:11 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel (zu zwei Zeiten: Beginn rote Kurven mit Beschriftung, unten rechts) in 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel überführt, entwickeln sich die Gonaden und die Mauser beginnt in einem bestimmten Abstand zum Übergang in 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel (rote Kurve für Gonadengröße und Balken für Mauser). Jeweils Januar markiert. Nach Gwinner and Dittami (1986). D154/Sturnus-jr2

kann induziert und beendet werden.

#### 12.4.4 Beispiele für Winterschlaf

Tiere in den gemäßigten und höheren Breiten der Erde sind im Winter Kälte und Nahrungsmangel ausgesetzt. Sie müssen deshalb besondere Strategien benutzen, um ihn zu überdauern. Der Winterschlaf ist eine solche Strategie bestimmter Säuger. Im Winterschlaf wird von diesen Tieren viel Energie eingespart. Diese Einsparung war vielleicht eine ursprüngliche Eigenschaft und wurde auch unter milden klimatischen Bedingungen mit genügend Nahrung benutzt. Unter härteren klimatischen Bedingungen und unter Nahrungsmangel haben sich dann einige Säuger und Marsupialier im Verlauf der Evolution darauf spezialisiert, auf diese Weise zu überleben. Winterschlaf unter milden klimatischen Bedingungen entspricht der Thermoregulation von Reptilien und wird auch bei einigen Vögeln (mouse-birds, Coliiformes, McKechnie and Lovegrove (2000)), Marsupialiern (Echidna, Grigg and Beard (2000) und Nicol and Andersen (2000)) und Eutherischen Arten (Lovegrove (2000)) gefunden.

Für Details verweise ich auf einen kürzlichen Bericht eines internationalen Symposiums (Heldmaier and Klingenspro (2000)) und einen Übersichtsartikel hin (Körtner and Geisler (2000)). Der Begriff 'Torpor´ wird benutzt, um das Auftreten von Hypo-Stoffwechsel, Hypothermie und Einschränkungen im Verhalten zu beschreiben. Mit Winterschlaf und Sommerschlaf (im englischen aestivation) werden jahreszeitliche Aspekte beschrieben, während der tägliche Torpor (siehe Seite 222) circadianer Natur ist (siehe Abbildung 12.25).

Zu den Säugern mit Winterschlaf gehören Chiroptera (Fledermäuse), Rodentia (Hamster, Murmeltiere, Bilche und andere Myoxidae) und Insektivoren (zum Beispiel der Igel). An einigen Beispielen wird der Winterschlaf im folgenden vorgestellt. Wie er induziert wird, wie er abläuft, und wie er beendet wird, sind einige Fragen. Was sind die Kennzeichen, die inneren und äußeren Faktoren, die physiologischen Grundlagen dieses Zustandes? Welche Regulationszentren sind beteiligt? Es werden einige Theorien und Modelle zum Winterschlaf vorgestellt.

Das Goldmantel-Erdhörnchen Spermophilus la*teralis* (=*Citellus lateralis*?) lebt im westlichen Nordamerika von British Columbien bis Californien in 1500-3600m Höhe. Die Tiere halten unter natürlichen Bedingungen einen obligatorischen Winterschlaf (Abbildung 12.22). Sie verbringen in diesem Zustand viele Monate unterirdisch im Dauerdunkel und bei mehr oder weniger konstanter Temperatur. Eine endogene Jahresrhythmik sorgt dafür, dass die richtige Jahreszeit nicht verpasst wird und der Winterschlaf rechtzeitig aufhört. Aber auch unter konstanten Bedingungen in einer Klimakammer zeigen sie weiterhin über mehrere Jahre hinweg Winterschlaf. Allerdings weicht die Periodenlänge von der Länge eines Jahres ab.<sup>2</sup> Es handelt sich also um eine endogene Jahresrhythmik (Abbildung 12.22).

Aber auch, wenn Zeitgeber wahrgenommen werden (Photoperiodismus, Aussentemperatur, Futter, Licht) und ein endogener Jahresrhythmus eigentlich nicht nötig ist, könnte eine innere Jahresuhr als Puffersystem zwischen Umwelt und Physiologie des Organismus dienen. Sie schützt gegen zum Beispiel Wetter-bedingte Umwelt-Störungen und baut eine gewisse Trägheit ein.

Aber nicht in allen Fällen wird der Winterschlaf durch einen endogenen Jahresrhythmus

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Sie kann beispielsweise nur 300 statt 365 Tage betragen. Von 61 Tieren hatten nur 13 einen Jahresrhythmus des Winterschlafes mit Periodenlängen, die länger als 365 d, waren. Die längste Periode war 445 Tage, die kürzeste 229 Tage.



Abbildung 12.22: Erdhörnchen (Spermophilus lateralis, sieben gezeigt) wurden für drei Jahre bei 3<sup>0</sup>C im 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel gehalten. Die Balken geben die Zeit an, zu der die einzelnen Tiere sich in Winterschlaf befanden. Die mittlere Periodenlänge beträgt 11 statt 12 Monate, ein sicheres Zeichen für einen endogenen Jahresrhythmus. Nach Pengelley et al. (1976). D174/winterschlafspermophilus

gesteuert. Man unterscheidet deshalb zwischen permissivem und obligatem Winterschlaf.

Warum Winterschlaf? Ursprünglich waren Säuger kleine Insektivoren mit nächtlicher Lebensweise. Ihre Körpertemperatur betrug um die  $30^{0}$ C, der Stoffwechsel entsprach etwa dem der Reptilien (1/4 rezenter Säuger). Höhere Körpertemperaturen waren nicht ertragbar. Wegen der geringen Körpergröße wäre der Wasserverlust zu riskant. Mit zunehmender Körpergröße konnte aber die Körpertemperatur auf einem höheren Durchschnittswert gehalten werden. Dadurch leben die Säuger sozusagen intern in den Tropen. Dann wurde die Homöothermie 'erfunden'. Sie erlaubte den Säugern, auch am Tag bei hoher Umgebungstemperatur aktiv zu sein und sich so an alle klimatischen Bedingungen der Erde anzupassen. Der Körper kann ja nur durch Transpiration gekühlt werden, wenn seine Temperatur höher ist als die der Umgebung.

Die Homöothermie hat einen hohen Selektionswert: Schnellere Reaktionsfähigkeit, auch in der Nacht (in der bei poikilothermen Tieren die Körpertemperatur auf die der Umgebung absinkt), Lebensmöglichkeit auch in Gebieten mit extremen Bedingungen. Selbst in heißen Gebieten kann der Körper jetzt gekühlt werden, sodaß er nicht auf lethale Temperaturen aufgeheizt wird (bei 45<sup>0</sup>C gerinnen die Proteine).

Im Winter erhöhen größere Säugetiere ihre thermische Isolation (Fett, Winterfell) und können dadurch der Kälte besser widerstehen. Oft suchen sie Schutz in der Erde und legen sich einen Futtervorrat zu. Bei kleinen Säugern wie den Nagern können allerdings die Kosten zu hoch sein. Sie haben ein ungünstiges Verhältnis von Körpervolumen zu Körperoberfläche. Dadurch ist bei Kälte ein hoher Stoffwechsel nötig (bei der Maus 20 mal höher als beim Schaf). Kleine Säuger<sup>3</sup> passen sich an den Winter an, indem sie den Stoffwechsel erhöhen. Andere geben im Winter den homöothermen Zustand (etwa  $37^0$ ) auf und gehen in Winterschlaf über. Die Körpertemperatur fällt auf oder in die Nähe der Aussentemperatur.  $0^{0}$ C ist dabei die untere Grenze. Wird diese Grenze erreicht, findet für eine Weile wieder die homöotherme Kontrolle statt. Säuger mit Winterschlaf könnten als heterotherme Tiere bezeichnet werden, da sie in diesem Zustand zwischen poikilothermen und homöothermen Tieren stehen: Sie können mit ihrer Körpertemperatur ein Sommer- und Winterprogramm fahren.

Äußere Faktoren: Der Winterschlaf kann zu jeder Jahreszeit beginnen, aber im Frühjahr ist die Tendenz dazu viel geringer. In der Regel wird er durch Kurztag und niedrige Außentemperatur induziert. Bevor der Winterschlaf beginnt, gibt es mehr und mehr Pha-

 $<sup>^3 {\</sup>rm sie}$  können nicht leichter als 2.5 g sein, da sonst nicht genügend Futter beschaffbar wäre für den extrem hohen Stoffwechsel

sen von Kältelethargie. Ein endogener Jahresrhythmus scheint das zu kontrollieren. Fettreserven werden angelegt.<sup>4</sup> Wichtigster äußerer Faktor für die Induktion des Winterschlafes ist die Photoperiode. Die photoperiodischen Signale des Kurztages werden über die Retina aufgenommen und über den retinohypothalamischen Trakt an den suprachiasmatischen Kern weitergeleitet. Von dort gelangt das Signal über das Cervikalganglion in das Pinealorgan, wo mehr Melatonin ausgeschüttet wird (Untersuchungen am sibirischen Hamster Phodopus, Abbildung 12.23). Im Winterschlaf fehlt

not found!
------------

Abbildung 12.23: Photoperiodische Induktion des Winterschlafes bei *Phodopus*: Die Retina nimmt das photoperiodisch wirkende Licht auf und leitet es über den hypothalamischen Trakt an den suprachiasmatischen Kern weiter zum Pinealorgan. Dort wird mehr Melatonin ausgeschüttet. Nach A32 (n.d.). 174A1/pp-phodopus

die Melatoninschwankung, die sonst 1:20 zwischen Tag und Nacht beträgt. Nach Beginn des Winterschlafes nimmt die Melatoninkonzentration schnell zu. Das führt zur Kälteresistenz. Die Gonaden sind rückentwickelt. Melatonin ist somit ein Signal für Kurztag. Die thermotropen Reaktionen sind auf den Spätsommer/Herbst beschränkt.

Auch andere äußere Faktoren beeinflussen den Winterschlaf: Er ist bei Tieren im Norden stärker ausgeprägt. Bei diesen nördlichen Populationen ist es wichtig, rechtzeitig (aber nicht zu zeitig) den Winterschlaf zu beenden, um früh genug mit der Fortpflanzung zu beginnen, aber spät genug, um ungünstige Bedingungen zu meiden. Ein flexibler Zeitpunkt wäre hier nicht günstig, er muß präzise sein. In Trockengebieten dagegen sind Umweltbedingungen weniger voraussagbar, hier ist Flexibilität wichtiger. Ausgeprägte Winterschläfer haben längere Winterschlafperioden, die seltener unterbrochen sind.

Auch die Aussentemperatur ist wichtig. Gartenschläfer (*Eliomys quercinus*), die im 12:12 h Licht-Dunkel-Wechsel bei  $12^0$  gehalten werden, gehen in den Winterschlaf. Bei  $22^0$  dagegen fällt der Winterschlaf aus.

Nach Beginn des Winterschlafes bleibt der Winterschläfer nicht dauernd in diesem Zustand. Vielmehr bringt ein innerer Oszillator die Tiere ungefähr alle 14 Tage für weniger als 24 Stunden wieder in den euthermischen Bereich des Lebens (French (1985), Barnes et al. (1986), siehe Abbildung 12.24). Die Dauer des Torpors zwischen diesen Aufwachperioden hängt von der Umgebungstemperatur ab und ist bei höherer Temperatur kürzer. Der Zeitpunkt des Aufwachens wird offenbar durch die Umgebungstemperatur und die Stoffwechselrate während der vorausgegangenen Winterschlafperiode bestimmt. Die energetischen Kosten dieses Aufwachens sind hoch. Warum Winterschläfer aufwachen, wurde auf verschiedene Weise erklärt. Nach einer neueren Hypothese (Deboer and Tobler (2000a)) leiden die Winterschläfer im Winterschlaf immer mehr unter slow-wave-sleep-Mangel und müssen diesen durch einen euthermischen nicht-REM-Schlaf abstellen. Nach dem Zwei-Prozess-Modell der Schlafregulation (siehe Abbildung 2.8) würde der Prozess S während des Winterschlafes asymptotisch ansteigen, bis er einen Schwellen-

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Im Kurztag wird beim Hamster die Menge an braunem Fett erhöht und die Mitosehäufigkeit in diesem Gewebe erhöht sich. Braunes Fett erhöht die Wärmeproduktion, sodaß kein Muskelzittern nötig ist. Die Mitochondrien haben ein entkoppelndes Protein, das die Leitfähigkeit der Mitochondrienmembran erhöht und damit die Atmung entkoppelt. Damit wird die Energie als Wärme frei statt als ATP.
wert erreicht, an dem das Tier aufwacht. Nach Harris and Milsom (2000) soll hingegen Winterschlaf und Schlaf sich ähneln.

Winterschlaf, Torpor und circadiane Uhr: Vor kurzem wurde berichtet, daß Torpor nicht nur dazu dient, Bedingungen mit niedrigen Umwelttemperaturen und Nahrungsmangel zu überdauern. Vielmehr wird er auch bei Vögeln, Marsupialiern und Säugern unter sonst günstigen Bedingungen gefunden. Offenbar dient er dazu, Energie einzusparen (Heldmaier and Klingenspro (2000)). Diese Art Torpor kann mehrere Monate anhalten, aber auch einmal täglich stattfinden.

Bei Cheirogaleus medius, einem Lemur von Madagaskar, wurde Winterschlaf (englisch Hibernation, hier Aestivation, Sommerschlaf, da während der Trockenzeit) mit täglichem Torpor beobachtet. Das Tier hält sich dazu in Baumhöhlen auf. Der Verlauf der Körpertemperatur und des Sauerstoffverbrauchs wurde telemetrisch in einer Feldstudie von Daussmann et al. (2000) registriert. Wie in Abbildung 12.25 gezeigt, sinkt die Körpertemperatur während der zweiten Hälfte der Nacht und bleibt für etwa 10 Stunden bis zum frühen Morgen niedrig. Auch im Sauerstoffverbrauch als Ausdruck des Stoffwechsels zeigt sich dieses Muster. Die Außentemperatur und -weniger ausgeprägt- die Temperatur in der Baumhöhle sinken im Vergleich zur Körpertemperatur einige Stunden früher ab. Trotz der relativ hohen Körpertemperatur während der frühen Nacht wacht das Tier während der Sommerschlaf-Periode nie völlig auf. Das steht im Gegensatz zu Winterschläfern, bei denen die Körpertemperatur während der meisten Zeit des Winterschlafes niedrig bleibt: Diese müssen periodisch aufwachen (siehe Abbildung 12.24). Wahrscheinlich ist die Energieeinsparung größer als bei Tieren, die täglichen Torpor ohne Winterschlaf besitzen.

Es ist nicht bekannt, ob der Torpor dieser Lemuren auch unter konstanten Temperaturen auftritt und ob ihm ein Jahresrhythmus zugrunde liegt.

Ergebnisse von Laborstudien zum Winterschlaf unterscheiden sich oft von solchen im Freiland. Telemetrisch übertagene Daten von Temperatursensoren zeigen, daß Torpor im Freiland häufiger, tiefer und länger ist (Geiser et al. (2000)). Circadiane Rhythmen der Körpertemperatur werden bei Winterschläfern im Labor beobachtet, aber nicht bei Tieren in der Natur, die im Dauerdunkel und unter sehr ruhigen Bedingungen überwintern. Entweder ist die Körpertemperatur bei ihnen nicht an den circadianen Schrittmacher gekoppelt, oder ihre circadiane Uhr funktioniert nicht unter Freilandbedingungen (Florant et al. (2000)).

Das zeitliche Muster der Aufwach-Schübe vom Winterschlaf wurde unter längerer niedriger Temperatur von  $6^{\circ}C$  bei homozygoten (-/-) und heterozygoten (+/-) tau Mutanten des Syrischen Hamsters gemssen und mit dem +/+Genotyp verglichen. Obwohl die Periodenlänge des circadianen Aktivitätsrhythmus sich bei den Tieren außerhalb des Winterschlafes unterscheidet (20, 22 beziehungsweise 24 Stunden), war die Dauer zwischen einzelnen Aufwachzeiten während des Winterschlafes statistisch gleich (88.8, 94.2 und 86.9 Stunden). Demnach scheint die circadiane Uhr nicht das periodische Aufwachen im Winterschlaf zu kontrollieren. Sonst müßten sich die Zeiträume zwischen den Aufwachzeiten unterscheiden (Oklejewicz et al. (2001)). Allerdings könnte auch ein separater circadianer Oszillator das periodische Aufwachen kontrollieren, der durch die Mutation nicht beeinflußt wurde.

Physiologie des Winterschlafs: Homöotherme Tiere halten ihre Körpertemperatur sehr konstant; bei Säugern sind das meistens Temperaturen um 37<sup>0</sup>C. Temperatur-Rezeptoren im Hypothalamus sorgen dafür, daß die Temperatur nachgeregelt wird, sobald



Abbildung 12.24: Telemetrische gemessene Körpertemperatur eines arktischen Erdhörnchens (*Spermophilus parryi*) während der Überwinterungszeit an einem nördlichen Hang eines Berges in Alaska. Nach Boyer and Barnes (1999). D174A/hibernation bouts



Abbildung 12.25: Täglicher Torpor bei *Cheirogaleus medius*, einem Lemur von Madagaskar. Körpertemperatur (magenta) und Sauerstoffverbrauch (rot, rechte y-Achse) wurden telemetrisch in einem Feldversuch gemessen. Zusätzlich wurde die Außentemperatur (blau) und die Temperatur in der Baumhöhle (green) gemessen und mit dem täglichen Licht-Dunkel-Zyklus (schwarze Balken) dargestellt. Nach Daussmann et al. (2000). D174B/lemur-hibernation

sie um mehr als 0.5<sup>0</sup> vom Sollwert abweicht. Das Körpertemperatur-regulierende Zentrum befindet sich im präoptischen hypothalamischen Gebiet (POAH). Ferner gibt es periphere Zentren. Auch im Winterschlaf und in Kältestarre finden diese Regulationen statt, aber mit einem niedrigeren Sollwert.

Im Winterschlaf sinkt die Körpertemperatur ab  $(4-20^0)$ , es wird nur wenig Wasser abgegeben und der Stoffwechsel beträgt nur noch 10 - 15 % des Normalwertes. Bei einer Körpertemperatur von  $4^0$  sinkt der  $O_2$  Verbrauch auf 1/15 bis 1/30 des normalen Wertes. Die Atemfrequenz und der Herzschlag sinken.

Winterschlaf ist jedoch nicht einfach ein Zustand, in dem Aktivität und Stffwechsel reduziert sind. Verschiedene Zell- und Gewebe-Bestandteile zeigen Änderungen zwischen einem aktiven und einem inaktiven Muster (Zancanaro et al. (2000)).

Der Organismus ist auf 'Sparflamme' umgeschaltet. Im Gegensatz zur Hypothermie, bei der die abgesenkte Körpertemperatur nur durch externes Aufwärmen wieder auf den normalen Wert gebracht werden kann, ist die Körpertemperatur im Winterschlaf weiterhin unter genauer physiologischer Kontrolle, allerdings auf einem niedrigeren Sollwert. Der Winterschlaf ist nicht kontinuierlich. Auch während des Winterschlafes melden Wärme- und Kälte-Sensoren in der Haut ständig die Außentemperatur an den Hypothalamus.

Änderungen im Zentralnervensystem, im endokrinen System, in Physiologie und Stoffwechsel begleiten den Winterschlaf. Das Gedächtnis ist allerdings im Winterschlaf nicht stark beeinflußt: Die Tiere erinnern sich zum Beispiel an die Lage alter Höhlen.

Der Intermediärstoffwechsel ändert sich im Winterschlaf. Fett dient als Reserve und Energiequelle. Braunes Fett ist Wärmequelle. Im späteren Teil des Aufwachens wird Glykogen verwendet. Das weisse adipose Gewebe ist ein wichtiges sekretorisches und endokrines Organ. Es gibt unter anderem Leptin. Dieses ist ein kritisches Signal für die Kontrolle des Energiegleichgewichtes und anderer Prozesse. Es könnte auch bei der Anpassung an Kälte und beim Winterschlaf eine Rolle spielen (Trayhurn et al. (2000)).

Der Säure-Base-Zustand ist im Winterschlaf geändert. Durch die Kohlensäure der Atmung wird der pH erniedrigt. Dadurch werden die Aktivitäten der Enzyme verändert.<sup>5</sup> Winterschlafende Tiere zeigen Bradykardie wie Säuger während des Tauchens.

Die DNA Synthese ist im Winterschlaf extrem niedrig, aber nicht völlig gehemmt. Rote Blutkörperchen reifen auch bei 8°C. Der Zellteilungszyklus ist unterbunden, und zwar in G2 und M (auch in G1?). Besonders gegen Ende des Winterschlafs, wenn die Tiere häufig erwachen, können sich die Zellen wieder teilen und werden ersetzt. Die Augen zeigen im Winterschlaf stärker degradierende Prozesse der Sehzellen. Nach dem Winterschlaf werden sie wieder restauriert (Reme, Young 1977).

Die elektrische Gehirntätigkeit beträgt im Winterschlaf nur noch 26% der normalen. Im Unterschied zum natürlichen Schlaf ist das EEG flach und viel langsamer. Das Schlafmuster ist völlig geändert. Im tiefen Winterschlaf gibt es keine elektrische Gehirntätigkeit mehr und der Cerebralcortex ist im Winterschlaf beim Goldhamster inaktiv, nicht aber beim Murmeltier. Häufiges Aufwachen erfolgt durch das vegetative Nervensystem. Das parasympathische Nervensystem ist im Winterschlaf inaktiv. Es wird erst nach dem Aufwachen aktiv. Der Goldhamster wacht leicht auf, der türkische Hamster nicht.

Das SCN spielt bei der Induktion und der Beendigung des Winterschlafes eine prominente Rolle. Die Neuropeptide und Neurotransmitter, die Lichtsignale zum SCN übertragen (Glutamat, Hypophysen-Adenylatzyklase aktivierendes Peptid, Neuropeptid Y) sind während des Winterschlafes fast inaktiv. Signale von anderen Teilen des Gehirns zum SCN (Serotonin, Substanz P, Somatostatin, Enkephalin) funktionieren noch während des Winterschlafes (Nürnberger et al. (2000)).

Die Immunreaktion ist im Winterschlaf erniedrigt.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Zum Beispiel sinkt die Aktivität der Phosphofruktokinase um 80%, wenn der pH um 0.1 Einheiten fällt.

Kranke Tiere halten keinen Winterschlaf. Wenn die Körpertemperatur sinkt, sterben sie.

Bei Störung oder auch spontan wachen Tiere auch ohne Kältereiz auf. Die Gründe dafür sind nicht bekannt. Es wird diskutiert, daß zu viele Ablagerungsprodukte sich angereichert haben, daß der Blutzuckerspiegel zu gering ist, daß ein endogener Rhythmus für das Aufwachen verantwortlich ist.

Die Gonaden können sich im Winterschlaf nicht entwickeln.

Männliche Erdhörnchen erwachen spontan aus dem Winterschlaf, Weibchen und Junge erst, wenn wieder Futter verfügbar ist.

Pinealektomie verhindert den Winterschlaf. Wird das SCN zerstört, dissoziieren der Jahresrhythmus der Reproduktion und der des Körpergewichts. Das spricht für mehrere circannuale Rhythmen. Welche dieser circannualen Rhythmen für den Winterschlaf zuständig ist, ist unbekannt. Wie die Entfernung der SCN auf den Winterschlaf wirkt, wurde von Ruby et al. (1998) bei niedriger Temperatur ( $6.5^{0}$ C) im 5. bis 7. Jahr untersucht.

Vor kurzem wurden Genexpression und Proteinanpassungen zwischen Arten mit und ohne Winterschlaf und bei Tieren während und außerhalb des Winterschlafes verglichen (Storey and Storey (2000), Martin et al. (2000)).

Theorien des Winterschlafs: Seasonbedingter Winterschlaf ist ein Phänomen, das immer noch nicht gut verstanden ist. Es ist wenig bekannt, wie er induziert, erhalten und beendet wird. Verschiedene Theorien zum Winterschlaf wurden vorgeschlagen: (siehe Heldmaier and Klingenspro (2000), Geiser et al. (1996), Carey et al. (1993), Heller et al. (1986), Lyman et al. (1982), Wang and Hudson (1978)), unter ihnen:

1. Nach Twente and Twente (1978) ist der Winterschlaf und das Erwachen aus dem Winterschlaf unabhängig von der Thermogenese-Regulation. Vielmehr regelt die parasympathisch-sympatische Aktivität den Winterschlaf. Es gibt eine autonome Winterschlaf-Erhaltungsreaktion. Das parasympathische System kontrolliert den Eintritt in den Winterschlaf und den späteren Teil des Aufwachens. Experimente mit Infusionen von Drogen ins Blut oder in spezifische Gehirngebiete sprechen für diese Hypothese.

Jedoch ist der parasympathische Einfluss nur Feinkontrolle, nicht grundlegender Prozess des Winterschlafs. Wenn Winterschlaf eingetreten ist, hat der Parasympathikus keinen Einfluss mehr. Temperatureffekte sind erst nach geändertem Stoffwechsel zu erwarten.

 Nach Heller and Glotzbach (1977) ist der Winterschlaf ein verlängerter Tiefschlaf (slow wave sleep). Dieser Teil des Schlafes zeichnet sich durch eine hohe Stoffwechselersparnis aus.

Nach neueren Untersuchungen sind die Tiere allerdings während des Winterschlafs nicht in einem eigentlichen Schlaf. Vielmehr unterbrechen sie den Winterschlaf, weil sie ein hohes Schlafdefizit haben (Trachsel et al. (1991), Deboer and Tobler (2000a)).

3. Nach Dawe (n.d.) gibt es Winterschlaf-Trigger-Substanzen: Wird Blut von winterschlafenden Tieren bei normaler Temperatur mehrfach in Erdhörnchen injiziert, wird Winterschlaf induziert. Auch mit einem Dialysat durch Membranen, die Moleküle über 5000 Da nicht durchlassen, ergab sich Winterschlaf. Diese Substanz ist nicht Art-spezifisch. Selbst bei Tieren, die keinen Winterschlaf halten, wie Rhesus-Affen und Makakken, senkt sie die Herzfrequenz. Der Rückstand induzierte keinen Winterschlaf. Es wurde versucht, diese Trigger-Substanz zu finden. Das braune Fett als 'Hibernating gland' kommt dafür nicht in Frage. Auch Pankreas, Insulin, Nebenniere, Corticotrope Hormone, Gehirnextrakte, Elektrolyte sind keine Winterschlaf-Trigger. Es ist unbekannt, ob es sich bei der Trigger-Substanz um ein Hormon handelt. Gibt es Antitrigger-Substanzen?

- 4. Kondo und Mitarbeiter (Kondo (1997), Kondo and Kondo (1996), Sekijima et al. (2000)) untersuchten Blutproteine, die für den Winterschlaf von Säugern spezifisch waren. Am Eichhörnchen Tamias asiaticus wurden 4 HP-Proteine im Blutplasma und ihre Transkripte gefunden, die während des Winterschlaf eine geringe Konzentration zeigten. Das wurde auch im Freilauf bei  $4^{0}$ C im Dauerdunkel über 5 Jahre beobachtet, wobei die Periodenlänge 8-12 Monate betrug. Es handelt sich also um eine endogene Jahresrhythmik. Sie wurde auch an der mRNA gefunden. Dieser Rhythmus wurde auch bei Tieren gefunden, die sich im 12:12 h Licht-Dunkel-Wechsel bei  $23^{0}$ C befanden. Unter diesen Bedingungen findet normalerweise kein Winterschlaf statt. Die Proteine HP 20, 25 und 27 wurden auch bei anderen winterschlafenden Nagern, aber nicht bei Ratten gefunden.
- 5. Nach Beckman und Mitarbeitern (Beckman et al. (1976a), Beckman et al. (1976b)) stellen die Retikularformation des Mittelhirns (MRF) und des präoptischen vorderen Hypothalamus (POAH) einen Mechanismen dar, von dem neuronale Eingänge in Hypothalamus und Hippocampus-Neurone gebahnt werden.

## 12.4.5 Eigenschaften der Jahresrhythmen

Wann liegt ein echter endogener Jahresrhythmus vor? Es könnten ja auch versteckte Zeitgeber den Rhythmus exogen steuern. Eine Reihe von **Kriterien** muß erfüllt sein, bevor man von einem circannualen Rhythmus sprechen kann:

- 1. Die Periodik muß über mehrere Zyklen verfolgbar sein
- 2. Die Periodenlänge sollte etwas von exakt 12 Monaten abweichen, also etwas kürzer oder länger sein.
- 3. Dieser endogene Jahresrhythmus muß durch jahreszeitliche Zeitgeber auf genau 12 Monate synchronisierbar sein.
- 4. Ein echter endogener Jahresrhythmus sollte robust und weitgehend Temperaturkompensiert sein.

Jahresrhythmen haben folgende **Eigenschaften**:

- Sie treten auch unter konstanten Bedingungen auf (das muß nicht Dauerlicht oder Dauerdunkel sein, sondern kann auch beispielsweise ein Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 Stunden sein, der dauernd gegeben wird).
- 2. Ihre Periodenlänge ist mehr oder weniger unabhängig von der Länge der Lichtperiode.
- Ihre Periodenlänge weicht in aller Regel von 12 Monaten ab, meistens ist sie kürzer als ein Jahr<sup>6</sup>.
- Ihre Periodenlänge ist unabhängig von der Temperatur (die dauernd konstant gehalten wird, aber zum Beispiel in einem Versuch 15<sup>0</sup>, in einem anderen Versuch 25<sup>0</sup>C betragen kann).
- 5. Sie sind vererbbar.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>Wenn die Periodenlänge genau 12 Monate beträgt, ist möglicherweise ein nicht erkannter Zeitgeber im Spiel.

#### 6. Der Ziehbereich ist begrenzt.

#### Dazu einige Anmerkungen:

Voraussetzung dafür, circannuale Rhythmen zu finden, sind konstante Umweltbedingungen, wie sie selten in der Natur (Tropen) zu finden, aber gut in Klimakammern herzustellen sind. Temperatur und Lichtbedingungen (vor allem Photoperiode) müssen konstant sein.

Der Mitnahmebereich des circannualen Systems ist zwar begrenzt, wie es für alle endogenen Oszillatoren zu erwarten ist, aber im Vergleich zu circadianen Rhythmen erstaunlich groß. Beim Geweihwachstum von *Cervus nippon* zum Beispiel können noch 4 Monate, aber auch 24 Monate mit sinusförmig variierter Länge der Lichtperiode den Jahresrhythmus 'mitnehmen' (Abbildung 12.26).

Es gibt gut und weniger gut ausgeprägte Jahresrhythmen, zum Teil in der gleichen Tierart und Population. Ist der endogene Jahresrhythmus weniger gut ausgeprägt, können die Tiere besser auf Umweltfaktoren reagieren. Langanhaltende (lebenslange) circannuale Rhythmen besitzen das Goldmantel-Erdhörnchen Spermophilus lateralis (Winterschlaf), das Eichhörnchen Tamias striatus (Körpergewicht), Gartenund Mönchsgrasmücke (Mauser). In anderen Fällen ist der Jahresrhythmus gedämpft. Das gilt für den Jahresrhythmus des Körpergewichtes bei einem amerikanischen Ziesel (Spiza americana) und der Mauser und Zugunruhe bei Phylloscopus collybita und Sylvia communis.

## 12.4.6 Zeitgeber der Jahresrhythmen, Synchronisation

Wichtigster Zeitgeber der circannualen Rhythmen ist in der Regel die Photoperiode. Das Geweih von *Cercus nippon* wächst im April bis Juni, wenn die Länge der Lichtperiode zunimmt (Goss (1976)). Auch bei *Sylvia borin* wurde nachgewiesen, daß die Dauer der Lichtperiode Zeitgeber des Jahresrhythmus ist. In Abbildung 12.27 wird der natürliche Jahresrhythmus der Östrus-Aktivität bei 'Southdown'-Schafen dargestellt. Er ist im Winter (der Südhalbkugel, daher Mai/Juni) am höchsten. Durch einen künstlichen Jahresgang der Photoperiode (um 6 Monate gegen den natürlichen verschoben, größere Amplitude der Tageslängen) läßt er sich verschieben. Die höchsten Werte liegen jetzt im Januar.

Murmeltiere (*Marmota monax*) wurden aus natürlichen Bedingungen von Pennsylvanien  $(40^{0}N)$  nach Sydney  $(34^{0}S)$  verfrachtet und auch dort im Freien gehalten. Drei Jahre später war ihr Jahresrhythmus um 6 Monate verschoben. (Abbildung 12.28 und Davis and Finnie (1975)). Es ist nicht bekannt, welche Zeitgeber in diesem Fall für die Synchronisation verantwortlich sind. Vermutlich ist es die Tageslänge.

Andere Zeitgeber können Jahresrhythmen synchronisieren, wie zum Beispiel Nahrungsangebot (Nahrungsmangel, Mrosowsky (1980)), Monsun (Niederschläge), soziale Zeitgeber (Mrosovsky (1988)). Aber auch ein Temperaturwechsel kann den Jahresrhythmus verschieben (Pengelley and Fisher (1963), Mrosowsky (1980)).

Die Photorezeptoren für photoperiodische Zeitgeber des Jahresrhythmus sind unbekannt.

## 12.4.7 Physiologische Grundlagen, Lokalisation, Modelle des Jahresrhythmus

Wo liegen die Generatoren für Jahresrhythmen? Nach Stetson (1971) und Kuenzel (1972) scheint der Hypothalamus beteiligt zu sein. Als neuroendokrine Achse fungieren Auge, Hypothalamus, Gonaden.

Ist eine interne Koinzidenz zwischen Neurotransmitter-Rhythmen Grundlage



Abbildung 12.26: Mitnahmebereich des Jahresrhythmus des Geweihwachstums (Balken) vom japanischen Sikka-Hirsch *Cervus nippon* in künstlichen 'Jahren' mit sinusförmig variierter Länge der Lichtperiode (von T=24 bis T=2 Monate). Nach Goss (1969). E170/mnb-jr

des circannualer Rhythmus? Und können circannuale Rhythmen durch Neurotransmitter neu angestossen werden? Wie funktioniert die Zeitmessung?

Ob Hormone für den Jahresrhythmus eine Rolle spielen, kann untersucht werden, indem man sie eliminiert oder zufügt.

Die Gonaden der Vögel und Säuger scheinen nicht am circannualen System beteiligt zu sein, da auch kastrierte Tiere noch Jahresrhythmen besitzen. Beginn und Ende der Gonadotrophinsekretion durch das Hypophysen-Hypothalamus-System wird durch einen circannualen Rhythmus bestimmt. Der Rhythmus funktioniert aber unabhängig von der Sekretion der Gonadenhormone. Das wurde an weiblichen Erdhörnchen (Zucker and Licht (1983)) und an männlichen Staren gezeigt (Gwinner and Dittami (1986)).

Auch das Pinealorgan beeinflußt den circannu-

alen Rhythmus kaum. Allerdings zeigen pinealektomierte Stare einen klareren Jahresrhythmus als Kontrolltiere. Das Pinealorgan ist jedoch für die photoperiodische Wirkung nötig. Auch bei Säugern wirkt Pinealektomie nicht auf den circannualen Rhythmus. Ohne Pinealorgan ist wie bei Staren der Jahresrhythmus klarer, die Periodenlänge bei *Mustela* etwas länger, beim Erdhörnchen etwas kürzer als bei nichtoperierten Tieren. Pinealektomie hat dagegen einen starken Effekt auf die Synchronisation des Jahresrhythmus. Bei *Mustela* und beim Schaf wird der Östrus im natürlichen Licht-Dunkel-Wechsel stark verzögert.

Weder der ventromediale Hypothalamus noch der paraventrale Kern noch die zentrale graue Zone des Mittelhirns sind für das Entstehen eines Jahresrhythmus verantwortlich. Das SCN beeinflußt unter bestimmten Bedingungen die Kopplung der circannualen Rhythmen von



Abbildung 12.27: Im oberen Teil der Abbildung (rote Kurve) ist der natürliche Jahresrhythmus der Östrusaktivität des 'Southdown'-Schafes zusammen mit dem Verlauf der natürlichen Tageslänge für eine geografische Breite von  $30^0 30'$  Süd (blaue Kurve, Tageslängen ändern sich zwischen 11 und 15 Stunden) gezeigt. Die ausgeprägteste Östrusaktivität findet sich im Winter (der Südhalbkugel, deshalb Mai/Juni). Sie kann um 6 Monate im Vergleich zum natürlichen Verlauf der Photoperiode verschoben werden (unterer Teil, rote Kurve), wenn ein künstlicher Jahreswechsel der Photoperiode (unterer Teil, blaue Kurve) sich um 180<sup>0</sup> von dem des natürlichen unterscheidet (Tageslängen ändern sich zwischen 9 und 17 Stunden, blaue Kurve im unteren Teil). Die höchsten Werte der Östrusaktivität finden sich jetzt im Januar. Nach Thwaites (1965). E169/jr-ppzg



Abbildung 12.28: Sieben Murmeltiere (*Marmota monax*, verschiedene Farben) wurden im ersten Jahr von Pennsylvanien ( $40^{0}$ N) nach Sydney ( $34^{0}$ S) verfrachtet und im Freien gehalten. Die Tageslänge für Pennsylvanien und Sydney ist als Funktion der jahreszeit in der oberen Kurve gezeigt. Drei Jahre später war der Jahresrhythmus des Körpergewichtes der Tiere um sechs Monate verschoben und zeigte jetzt die gleiche Phasenbeziehung zur Jahreszeit (und Tageslänge) wie in Pennsylvanien. Nach Davis and Finnie (1975). D168/marmotaverfrachtung Körpergewicht und Reproduktion.

# 12.5 Genetik der Jahresrhythmen

Jahresrhythmen sind genetisch verankert: Jungtiere von *Citellus lateralis*, die unter Konstantbedingungen geboren wurden, besitzen einen Jahresrhythmus. Mönchsgrasmücken (*Sylvia atricapilla*) brüten in Europa einmal pro Jahr. Die afrikanische Rasse von den Kap Verde Inseln brütet dagegen zweimal pro Jahr. Kreuzungen zwischen beiden zeigen ein intermediäres Verhalten dieser unterschiedlichen jahresperiodischen Muster (Abbildung 12.29, Berthold and Querner (1982)).

# 12.6 Adaptive Bedeutung von Jahresrhythmen

Jahresrhythmus sind unter Organismen weit verbreitet. Welche Bedeutung könnten sie haben? Wenn jahresperiodische Zeitgeber fehlen, wie in den Tropen oder am Boden des Meeres (siehe *Gonyaulax*), ist eine Jahresuhr sicherlich von Vorteil. Außerdem können sich Organismen mit einer Jahresuhr gegen unzuverlässige Reize der Umwelt wie Temperatur und Feuchtigkeit absichern. Jahreszeiten können antizipiert werden, zum Beispiel im Samen der Pflanzen.

Ein innerer Jahreskalender ist auch von Vorteil, wenn Tiere unter konstanten Bedingungen leben, aber zu bestimmten Zeiten des Jahres bestimmte Vorgänge oder Verhaltensweisen initiieren müssen. Das gilt zum Beispiel für das Beenden des Winterschlafes oder für den Zug in die Brutgebiete bei Zugvögel, die in den Tropen überwintern. Ohne circannuale Uhr wären diese Organismen Spielball der



Abbildung 12.29: Stärke und Dauer der Zugunruhe (Zahl der nächtlichen 0.5 Stunden-Intervalle mit Aktivität) unterscheiden sich bei Mönchsgrasmücken (*Sylvia atricapilla*) von Deutschland (durchgezogene Kurve) und einer afrikanischen Varietät von den Kanarischen Inseln beträchtlich (Punktkurve). Die Nachkommen (F1-Hybriden, gestrichelte Kurve) zeigen ein intermediäres Verhalten. Nach Berthold and Querner (1982). D172/jr-genetik

Umweltbedingungen, und eine vorübergehende Unregelmäßigkeit in der Periodik der Umwelt könnte verheerende Folgen haben. Ein innerer Kalender erlaubt dagegen zeitgerechtes Verhalten. Die Tiere werden nicht überrascht, sondern sind auf die Änderungen der Umwelt 'innerlich' vorbereitet. Das ist vielleicht auch der Grund dafür, warum die meisten endogenen Jahresrhythmen kürzer als 12 Monate sind. Die innere Jahresuhr 'läutet' dann schon vor Beginn der zu erwartenden Ereignisse und die Tiere können sich beizeiten darauf vorbereiten (siehe Diskussion bei Gwinner (1986)). Dadurch können beispielsweise Fortpflanzung und Winterschlaf in die richtige Jahreszeit gelegt werden, die Geschlechter können zu Beginn der Fortpflanzungszeit synchronisiert werden, spezifische Zeitprogramme können als Handlungsketten ablaufen.

Die circannuale Uhr steuert auch die Dauer und Amplitude von Vorgängen (Abbildung 12.30). Das bedeutet, daß in dem abgebildeten Fall auch die Höhe des Fettdepots für die einzelnen Phasen des Winterschlafes vorprogrammiert ist. Bei sechs verschiedenen Sylvia-Arten (Sylvia borin, cantillans, communis, atricapillata, melanocephala und sarda) ist die Dauer, Menge und das zeitliche Muster der Zugunruhe vorprogrammiert. Durch die Vektoren-Navigation finden auch unerfahrene Zugvögel automatisch ihr Zug-Ziel.



Abbildung 12.30: Eine Jahresuhr kontrolliert die Dauer und Amplitude der nächtlichen Aktivität. Bei den Sylvia-Arten borin, cantillans, communis, atricapillata, melanocephala und sarda sind Dauer, Menge und Zeitmuster der Zugunruhe vorprogrammiert. Die nächtliche Aktivität (Zahl der nächtlichen 0.5 Stunden-Intervalle mit Aktivität) ist bei den Langstrecken-Fliegern am höchsten and längsten. Nach Berthold (1973). D173A/jr-bedeutung

# Kapitel 13

# Photoperiodismus

Damit der Jahresrhythmus mit dem Jahreslauf synchronisiert wird, müssen Zeitgeber der Umwelt perzipiert werden und auf den endogenen Jahresrhythmus einwirken. Der zuverlässigste Zeitgeber für die Jahreszeit ist die Photoperiode. Deshalb werden photoperiodische Informationen von zahlreichen Organismen benutzt, um ihren Jahresoszillator mit der Umwelt zu synchronisieren. Andererseits gibt es aber auch viele Organismen, die photoperiodische Reaktionen zeigen, ohne einen Jahresrhythmus zu besitzen. Im folgenden werden wir Beispiele photoperiodischer Reaktionen kennen lernen. Als erstes Beispiel dient ein Einzeller, Gonyaulax. Danach werden photoperiodische Reaktionen von Pflanzen vorgestellt (Speicherorgane, Samen, Blühinduktion). Die Diapause von Insekten, ein Ruhestadium, wird sehr häufig photoperiodisch kontrolliert. Auch die Reproduktion der Säuger ist in den meisten Fällen durch die Tageslänge geregelt. Als Beispiel für Photoperiodismus bei Vögeln dient die Steuerung der Reproduktion bei der Wachtel.

# 13.1 Photoperiodismus bei einer Alge

bereits Wir hatten den Dinoflagellaten Gonyaulax polyedra kennen gelernt: Er zeigt einen tagesperiodischen Rhythmus der Biolumineszenz. Um zu überwintern, bildet diese Alge Zysten. Sie sinkt dazu auf den Boden, wirft die Panzerschale ab und bildet eine neue Hülle (Zyste). Die Enzystierung von Gonyaulax polyedra wird photoperiodisch gesteuert Balzer and Hardeland (1991). Bei einer Wassertemperatur unter  $16^{0}$ C bilden diese Algen im Kurztag asexuelle Zysten als Ruhestadium aus. Abbildung 13.1 (Balzer and Hardeland (1992)) zeigt den Prozentsatz Zysten in der Population als Funktion der Länge der Lichtperiode. Bei 11 Stunden Licht pro Tag sind keine Zysten zu finden, bei 10.5 Stunden Licht sind alle Zellen enzystiert. Von photoperiodischen Reaktionen ist bekannt, dass ein Kurztageffekt durch Licht in der Mitte der Dunkelperiode aufgehoben wird und eine Langtagreaktion stattfindet. So auch hier: Die Zystenbildung kann durch eine zweistündige Belichtung während der Mitte der Dunkelperiode unterbunden werden. Es handelt sich also um eine echte photoperiodische Reaktion und nicht um eine Reaktion, die durch die Lichtmenge bedingt ist.

Allerdings müssen die Temperaturen  $16^{\circ}$ C



Abbildung 13.2: Im Kurztag von 10:14 stündigem Licht-Dunkel-Wechsel (linker Teil, grüne Kurve) bilden sich nach wenigen Tagen Zysten (Prozentsatz Ordinate), während im Langtag von 11:13 stündigem Licht-Dunkel-Wechsel keine Zysten zu finden sind. Bei Temperaturen über  $15^{0}$ C werden auch im Kurztag keine Zysten gebildet (rechter Teil, 12:12 stündiger Licht-Dunkel-Wechsel, grüne Kurve). Wird dem Medium jedoch Methoxytryptamin (2 \*  $10^{-5}$ M) im Kurztag zugegeben (linker Teil, rote Kurve), bilden sich in den nächsten Tagen (Abszisse) Zysten. Auch bei höherer Temperatur (rechter Teil, rote Kurve) induziert Methoxytryptamin im 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel Zysten. Nach Balzer and Hardeland (1992). D176A/pp-gony-warm

oder tiefer sein (linker Teil der Abbildung 13.2, grüne Kurve Kurztagbedingung 10:14 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus, vergleiche mit nicht-induktiven Bedingungen 11:13 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus, blaue Kurve). Bei höheren Temperaturen findet trotz Kurztag keine Zystenbildung statt (rechter Teil der Abbildung (12:12 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus, grüne Kurve).

Asexuelle Zysten werden aber auch im Langtag gebildet, wenn dem Medium Melatonin oder, noch wirksamer, das Melatonin-Analogon 5-Methoxytryptamin zugegeben wird (Abbildung 13.2, linker Teil, rote Kurve, Balzer and Hardeland (1992)). Mit 5-Methoxytryptamin kann die Enzystierung sogar im Dauerlicht bei  $20^{0}$ C induziert werden.

Bei Vertebraten werden photoperiodische Signale der Umwelt ebenfalls durch Melatonin (im Pinealorgan) dem Organismus mitgeteilt (siehe Abschnitt 20.8). Melatonin ist in *Gonyaulax* in höherer Konzentration enthalten als im Pinealorgan. Wie bei Vertebraten schwankt auch bei *Gonyaulax* die Melatoninkonzentration tagesperiodisch und circadian (Balzer et al. (1993), Abbildung 13.3). In beiden Fällen liegt das Maximum der Synthese kurz nach Beginn der Dunkelperiode (Pöggeler et al. (1991)

Melatonin ist ein Indolamin und bei Tieren weit verbreitet. Es ist ein Radikalen-Fänger: Durch Licht gebildete Superoxidanionen werden durch Melatonin mit Hämin als Katalysator zu Kynuramin (AFMK) abgebaut (Hardeland et al. (1996)). Während Melatonin den Organismen als Information für Dunkelheit dient, ist AFMK ein Indikator für Licht. Diese Vorgänge scheinen bei dem Einzeller und bei Säugern ganz ähnlich zu sein und deuten auf einen gemeinsamen Ursprung in der Evolution hin.





Abbildung 13.1: Im Kurztag (bis zu einer Tageslänge von 10.5 Stunden) bildet *Gonyaulax polyedra* Zysten. Ist die tägliche Lichtperiode 11 Stunden oder länger, werden keine Zysten gebildet. Der Prozentsatz gebildeter Zysten ist als Funktion der Tageslänge dargestellt. Nach Balzer and Hardeland (1992). D175/ppgonyaulax

Abbildung 13.3: Circadianer Rhythmus der Melatoninbildung (ng/mg Protein) bei Gonyaulax polyedra nach Übertragen der Kultur aus einem 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel in Dauerdunkel (zum Zeitpunkt 0, Abszisse). Nach Balzer et al. (1993). D177/ melatonin-gonyaulax Photoperiodische Reaktionen sind auch von anderen Algen bekannt (Conchiosporen von *Ulva*, Monosporenbildung bei *Porphyra*, siehe Rentschler (1967), Dickson and Waaland (1985), Übersicht Lüning (1980) und Dring (1970)).

# 13.2 Photoperiodismus bei Pflanzen

Bei vielen Pflanzen stehen bestimmte Entwicklungsschritte und physiologische Vorgänge unter photoperiodischer Kontrolle. In diesem Abschnitt werden einige Beispiele vorgestellt. Zunächst werden photoperiodische Reaktionen der Knollen- und Zwiebelbildung besprochen. Dann lernen wir Induktionen der Samenruhe und Samenkeimung durch die Photoperiode kennen. Schließlich beschäftigen wir uns mit einigen Beispielen für photoperiodische Blühinduktion.

Die photoperiodische Reaktion kann durch Langtag oder durch Kurztag gefördert werden. Wichtig ist dabei nicht die absolute Länge der Lichtperiode (oder Dunkelperiode). Ausschlaggebend ist vielmehr, ob eine kritische Länge unter- oder überschritten werden muss, damit es zur photoperiodischen Reaktion kommt ?. Außerdem können während der Entwicklung einer Pflanze häufig mehrfach photoperiodische Weichen gestellt werden, die auch zu unterschiedlichen Typen (Langtag, Kurztag) gehören können (Beispiel: Zea mays).

Eine ausführliche ältere Zusammenstellung findet sich in Vince-Prue (1975). Neuere Übersichten sind in Thomas (1998) zu finden.

# 13.2.1 Photoperiodische Kontrolle von Speicherorganen.

Speicherorgane entstehen durch Schwellen verschiedener Gewebe wie Stängel (ergibt Knollen und Rhizome), Wurzeln (ergibt knollige Wurzeln und Wurzelknollen), Blätter (Brutknollen). Mit diesen Speicherorganen können Pflanzen ungünstige Bedingungen überdauern und Material speichern (Tabelle 13.1). Wie bei der photoperiodischen Blühinduktion ist auch bei Speicherorganen das Blatt Aufnahmeorgan des photoperiodischen Reizes. Die Dunkelperiode ist für die Reaktion verantwortlich. Die Induktion geschieht über das Pigmentsystem Phytochrom (siehe 20.13). Nach der Induktion wird der Reiz an den Reaktionsort weitergeleitet.

Bei *Begonia evansiana* genügen bereits ein bis zwei Kurztage zur Induktion der Luftknollen. In anderen Fällen wie beispielsweise den Zwiebeln sind mehrere photoperiodische Zyklen nötig und ein photoperiodischer Zähler ist beteiligt.

Einige Beispiele photoperiodischer Steuerung bei Speicherorganen werden im folgenden vorgestellt:

#### Kartoffelknolle

Die Knollenbildung bei der Kartoffel wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst. Dazu gehören Temperatur, Stickstoffgehalt, physiologisches Alter der Pflanzen und vor allem Photoperiode. Bei den ursprünglichen Kartoffelsorten von Südamerika werden die Knollen im Kurztag induziert. Langtag hemmt die Knollenbildung. Auch südamerikanische Kulturformen wie Solanum demissum und Solanum tuberosum ssp. andigena bilden nur im Kurztag Knollen. In Lichtperioden oberhalb der kritischen Tageslänge unterbleibt die Knollenbildung (Ewing and Struik (1998)). Entscheidend ist dabei die Länge der Dunkelperiode. Wird die Nacht von einem Lichtpuls unterbrochen, bilden sich keine Knollen. Rotes Licht ist am wirksamsten. Dunkelrotes Licht hebt den Rotlichteffekt wieder auf. Phytochrom (sie-

# Tabelle 13.1: Speicherorgane von Pflanzen.

begünstigt durch Kurztag		
Erdnuss (Apios tuberosa)	Wurzelknollen	Garner and Allard (1923)
Begonia evansiana	oberirdische Stängelknollen	Esashi (1960)
Begonia socotrana	oberirdische Stängelknollen	Nitsch (1966)
Begonia tuberhybrida		
cv Camelliaflora	unterirdische Stängelknollen	Lewis $(1953)$
cv Multiflora	unter- und oberirdische Stängelknollen	Lewis $(1953)$
Dahlia hyprida	Wurzelknollen	Nitsch $(1966)$
Discorea divaricata	oberirdische Achselknollen	Garner and Allard (1923)
Yams (Discorea alata)	Wurzelknollen	Garner and Allard (1923)
Gladiolus spec.	cormels	Asahira et al. (1968)
Artischocke (Helianthus tuberosus)	unterirdische Stängelknollen	Hamner and Long $(1939)$
Kartoffel (Solanum tuberosum)	unterirdische Stängelknollen	Wassink and Stolwijk (1953)
begünstigt durch Langtag		
Lauch (Allium ascallonicum)	Zwiebeln	Jenkins (1954)
Zwiebel (Allium cepa)	Zwiebeln	Magruder and Allard (1937)
garlic (Allium proliferum sativum)	unter- und oberirdische Knollen	Reimers (1957)
Brodiaea laxa	Corme	Fortanier (1969)

he Abschnitt 20.13) ist demnach der Photorezeptor für das photoperiodisch wirkende Licht (Batutis and Ewing (1982)), und zwar Phytochrom B, wie Versuche mit Antisens-Pflanzen zeigen (siehe Jackson and Thomas (1998)). Die meisten europäischen und nordamerikanischen Kulturformen zeigen nur noch eine schwache photoperiodische Reaktion oder bekommen auch im Langtag Knollen (Frühkartoffeln!).

Die Perzeption des photoperiodisch wirkenden Lichtes geschieht in den Blättern. Die Länge der Dunkelperiode wird von einem circadianen Mess-System ermittelt. Ist die Dunkelperiode länger als eine kritische Dauer, wird ein Signal gebildet<sup>1</sup> und zu den unterirdischen Sprossen (Stolonen) geleitet. Wahrscheinlich besteht das Signal aus einer induzierenden Substanz, die unter induktiven Bedingungen zunimmt, und einer hemmenden Substanz, die unter induktiven Bedingungen abnimmt. Als hemmende Substanzen kommen Gibberelline in Frage (Tizio (1971)). Jasmonsäure sowie Tuberonsäure sind möglicherweise fördernde Substanzen ((Koda et al. (1988), Abbildung 13.4). Jasmonat wird über Lipoxygenase (LOX) gebildet. Die Aktivität der LOX wird durch Kurztag erhöht. Es ist ferner bekannt, dass die Synthese von Gibberellinsäure photoperiodisch beeinflusst wird (Gilmour et al. (1986)). Kartoffelknollen werden gebildet, indem sich die Stolonen an ihren Spitzen verdicken (Abbildung 13.5). Dabei strecken sich die Zellen quer zur Längsachse und lagern Stärke ein.<sup>2</sup> Die kleinen Schuppenblättchen der Kartoffelknolle fal-



Abbildung 13.4: Werden Kartoffelscheiben auf Agar gelegt, dem  $10^{-4}$ M Jasmonsäure zugefügt wurde, strecken sich die Zellen (rechter Teil der Abbildung). Kontrolle ohne Jasmonat links. Nach Takahashi et al. (1994). 178/kartoffeljasmonat

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Dieses Signal lässt sich durch Pfropfen nachweisen. Induzierte Blätter der Kartoffel bringen auch im Langtag gehaltene Pflanzen zur Knollenbildung, wenn sie erfolgreich aufgepfropft worden sind. Im Kurztag induzierte Blätter von Tabakpflanzen können Kartoffeln im Langtag ebenfalls dazu bringen, Knollen zu bilden (Chailakhyan et al. (1981), Martin et al. (1982)).

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Methyljasmonat unterbindet das Längenwachstum und fördert die Streckung in radialer Richtung.

len frühzeitig ab. Die Blattnarben sind noch zu erkennen. In ihnen sind die Achselknospen als Augen eingesenkt. Sie treiben später zu Seitentrieben aus.



Abbildung 13.5: Im Kurztag bilden sich an den Enden der unterirdischen Stolonen der Kartoffelpflanze Knollen, die sich senkrecht zur Längsachse verdicken. Die horizontale Linie deutet die Oberfläche des Bodens an. Wurzelsystem unter den Stolonen. 179/kartoffel

## Zwiebeln

Zwiebeln werden im Gegensatz zu den Knollen der Kartoffel in den meisten Fällen im Langtag gebildet. Die Küchenzwiebel *Allium cepa* und *der* Knoblauch *Allium proliferum* sind Beispiele (Abbildung 13.6). Die gelbe Zittauer Zwiebel braucht mindestens 14 Stunden Langtag. In südlicheren Breiten sind Stämme verbreitet wie die süße spanische Zwiebel, die auch in kürzeren Tageslängen (12-13 Stunden) Zwiebeln ansetzt. Ihre kritische Tageslänge ist also kürzer. Um Zwiebeln zu bilden, sind bei *Allium ascalonicum* 7 bis 28 Langtage nötig (Esashi (1961)).



Abbildung 13.6: Abhängigkeit der Zwiebelbildung (Prozentsatz) bei drei verschiedenen Allium cepa Kultursorten von der Tageslänge (Stunden). Nach Magruder and Allard (1937). D180/pp-zwiebel

## 13.2.2 Photoperiodische Kontrolle der Sukkulenz

Bei zahlreichen Sukkulenten wird die Sukkulenz der Blätter photoperiodisch gesteuert. Bei *Kalanchoe blossfeldiana* werden im Kurztag kleine, rigide, sukkulente Blätter gebildet. Im Langtag dagegen sind die Blätter dünn, flexibel und groß (Abbildung 13.7). Auch ausgewachsene Blätter werden noch im Kurztag sukkulent und sind dann dreimal dicker als die Langtagblätter. Die Sukkulenz der Blätter kommt zustande, indem sich die Zellen quer zur Blattfläche vergrößern und Wasser aufnehmen. Der dafür im Kurztag gebildete Reiz lässt sich durch Pfropfen übertragen.



Abbildung 13.7: Blätter von Kalanchoe blossfeldiana im Langtag (links) und im Kurztag (rechts). Darunter: Querschnitt durch Langtagblatt (links) und Kurztagblatt (rechts). Nach Harder and Witsch (1941). 181/sukkulenz-kala

## 13.2.3 Andere photoperiodische Wirkungen

Auch andere photoperiodische Wirkungen sind bei Pflanzen bekannt. Wurzelbildung, Blattfall, Knospenbildung und Knospenruhe bei Bäumen und Sträuchern, Stängelstreckung, vegetatives Wachstum, Kambiumaktivität, Gewebedifferenzierung, Kälteresistenz, Fertilität, Geschlechtsbestimmung und -Ausprägung sind einige Stichworte (Vince-Prue (1975)).

# 13.2.4 Photoperiodische Reaktionen bei Samenruhe und Samenkeimung

Der Entwicklungsgang einer Samenpflanze war in Abbildung 12.1 dargestellt. Der Embryo im Samen einer Pflanze enthält typischerweise bereits alle Gewebe der vegetativen Pflanze. Bevor er sich aber weiterentwickelt, geht er in eine Stoffwechselruhe über. Dadurch wird der Samen geschützt und kann ungünstige Umweltbedingungen überdauern. Dieser Stopp der Entwicklung ist nicht eine automatische Folge der Embryogenese, da es auch Ausnahmen gibt (Mangroveembryo). Bei vielen Pflanzen keimen die Samen, wenn Wasser zur Verfügung steht und dadurch Gasaustausch möglich wird. Bei anderen dagegen sind zusätzlich noch photoperiodische Signale oder niedrige Temperatur (Vernalisation) nötig, um den Entwicklungsstop zu beenden. In wiederum anderen Fällen wird die Samenruhe durch einen endogenen Jahresrhythmus kontrolliert (Abschnitt 12.1.1).

Beispiele für photoperiodische Kontrolle der Samenkeimung sind Lactuca sativa, Betula pubescens (Abbildung 13.8) und Betula pendula (Vanhatalo et al. (1996)). Auch die Samenruhe kann photoperiodisch gesteuert sein, so bei Desmodium barbatum. Samen, die an Pflanzen im Kurztag reiften (8 Stunden Lichtperiode), haben eine höhere Keimrate als Samen von Pflanzen, die im Langtag reiften (18 Stunden Lichtperiode) (Siqueira and Valio (1992)).



Abbildung 13.8: Die Samen der Birke *Betula* pubescens zeigen im Kurztag (2 bis 8 Stunden Licht pro Tag) eine niedrige Keimrate, während im Langtag (20:4 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus) 90 % keimen (15°C). Nach Black and Wareing (1955). D182/samen-pp

## 13.2.5 Photoperiodismus und Blühen

Damit Blüten gebildet werden und Samen zur richtigen Zeit reifen, benutzen Pflanzen ein kompliziertes Regelsystem. Es kontrolliert den Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Zustand des Apex. Ein Teil dieses Regelsystems berücksichtigt den Entwicklungszustand: erst wenn die Pflanze eine Jugendphase durchlaufen und ein gewisses Alter erreicht hat, kommt es zur Blütenbildung. Das ist der **autonome Weg** der Blühkontrolle. Ein anderer Teil des Regelsystems nimmt Umweltsignale wie Tageslänge, Temperatur und Bodenfeuchte wahr. Erst, wenn dieser **Umwelt-reaktive Weg** richtige Bedingungen meldet, können sie blühen. Ob der autonome oder der Umweltreaktive Weg überwiegt, hängt von den Pflanzen ab und variiert stark (Aukerman and Amasino (1996)). Zu den Umwelt-Bedingungen, die das Blühen steuern, gehört bei vielen Pflanzen die Tageslänge. Ihr Blühen wird also erst durch bestimmte photoperiodische Bedingungen induziert. Ein neueres Buch über Photoperiodismus ist von Thomas and Vince-Prue (1997).

An der Blühinduktion wurde der Photoperiodismus entdeckt und der Begriff kreiert (Garner and Allard (1920)). Kurztagpflanzen blühen, wenn eine kritische Lichtperiode unterschritten wird, Langtagpflanzen, wenn eine kritische Lichtperiode überschritten wird (Abbildung 13.9). Für Untersuchungen werden oft folgende Objekte verwendet: Die Kurztagpflanzen Pharbitis nil (Kaiserwinde), Chenopodium rubrum (Gänsekraut), Kalanchoe blossfeldiana (feuriges Käthchen), Glycine max (Sojabohne), Xanthium pennsylvanicum (Spitzklette), die Langtagpflanzen Lolium perenne (ein Gras) und Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand), um nur einige zu nennen (Abbildung 13.10). Unter den photoperiodisch reagierenden Pflanzen gibt es aber auch Pflanzen, die erst blühen, wenn sie zunächst im Kurztag waren und dann in Langtag kommen (so genannte Kurz-Langtagpflanzen). Bei den Lang-Kurztagpflanzen ist das gerade umgekehrt (Evans (1969)). Tag-neutrale Pflanzen blühen unabhängig von der Tageslänge im Kurz- und Langtag.

Photoperiodische Blühinduktion ist enorm wichtig für Landwirtschaft und Gartenbau (Übersicht: Salisbury (19)).

Die photoperiodische Steuerung der Blütenbildung ist ein komplexer Vorgang und recht vielfältig. Untersuchungen dieser Prozesse sind interessant und wichtig, wenn man die Indukti-



Abbildung 13.9: Kurztagpflanzen blühen, wenn eine kritische Lichtperiode *unterschritten* wird, Langtagpflanzen, wenn eine kritische Lichtperiode *überschritten* wird. Durchgezogene Kurve: *Pharbitis nil* Stamm violett (Kurztagpflanze). Gestrichelte Kurve: *Lolium perenne* (Langtagpflanze). Nach Imamura et al. (1966) (*Pharbitis*) und nach Bernier (1969) (*Sinapis*). D183A/critical-tageslänge



Abbildung 13.10: Kurztagpflanzen a: *Pharbitis nil* (Kaiserwinde), b: *Chenopodium rubrum* (Gänsekraut), c: *Kalanchoe blossfeldiana* (feuriges Käthchen), d: *Glycine max* (Sojabohne), und e: *Xanthium pennsylvanicum* (Spitzklette). Langtagpflanzen f: *Lolium perenne* (ein Gras) und g: *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand). 183v/ktp-ltp

on und Entwicklung von Blüten verstehen will. Wenn man dagegen mehr an der photoperiodischen Steuerung interessiert ist, sollte man besser einen einfacheren photoperiodisch gesteuerten Vorgang untersuchen: Wenn zum Beispiel durch Kurztag das Wachsen in die Längen durch Breitenwachstum abgelöst wird oder wenn Knollenbildung induziert wird.

## Vom photoperiodischen Reiz zur Blüte: photoperiodische Induktion

Zunächst muss der photoperiodische Reiz perzipiert werden. Das findet im Blatt statt. In Mesophyll und der Epidermis des Blattes sind Rezeptoren für das photoperiodisch wirkende Licht. Sie sind bei den verschiedenen Pflanzen unterschiedlich. Phytochrome sind die wichtigsten Rezeptoren bei der Blühinduktion (siehe Abschnitt 20.13). Bei Kreuzblütlern sind Blaulicht-Rezeptoren dafür zuständig. Wird eine kritische Dunkelperiode überschritten (Kurztagpflanzen) oder unterschritten (Langtagpflanzen), werden von den Zellen im Blatt Substanzen gebildet, die über das Transportsystem zum Apex gelangen und diesen von vegetativer auf reproduktive Entwicklung umschalten. Die Pflanze wird zum Blühen induziert. Ein Zeitmeßsystem und ein photoperiodischer Zähler spielen eine wichtige Rolle (Abbildung 13.11). Die Zeitmessung erfolgt durch ein circadianes System. Dabei scheint bei Langtagpflanzen eine kritische Tageslänge (Lichtperiode), bei Kurztagpflanzen eine kritische Dunkelperiode gemessen zu werden. Deshalb spricht man auch von Licht-dominanten und Dunkel-dominanten Pflanzen.

Es sind also verschiedene Vorgänge, mit denen wir uns im Folgenden etwas genauer beschäftigen müssen, um die Blühinduktion zu verstehen:

1. Im Blatt wird das photoperiodisch wirken-

de Licht durch Photorezeptoren perzipiert.

- 2. Im Blatt wird die Tageslänge gemessen.
- 3. Bei geeigneter Tageslänge und bei genügend vielen induktiven Zyklen werden im Blatt Substanzen gebildet, die letztlich zur Blütenbildung führen.
- 4. Diese Substanzen ('Florigen') werden zum Apex transportiert.
- 5. Florigen stimmt den Apex um, sodass er nicht mehr vegetativ wächst, sondern letztlich Blüten bildet (Blühinduktion).
- 6. Im umgestimmten Apex kommt es über Änderungen in Genaktivitäten zur Blütenbildung.

#### Photorezeptoren der Tageslänge

Welche Photorezeptoren nehmen die photoperiodischen Signale der Umwelt wahr? Bei der Erbse ist Phytochrom (siehe Abschnitt 20.13) dafür verantwortlich (Weller et al. (1997)). Bei Arabidopsis thaliana dagegen ist neben Phytochrom auch ein Blaulicht-Rezeptor, Cryptochrom, an der Wahrnehmung der Tageslänge beteiligt (Johnson et al. (1994), Reed et al. (1994), Guo et al. (1998)). Genaueres auf Seite 254.

#### Florigen

Wenn die kritische Tageslänge überschritten (Langtagpflanzen) oder unterschritten (Kurztagpflanze) ist, soll im Blatt nach Chailakhyan (1936a) ein Blühhormon ('Florigen') gebildet werden. Nach anderen Hypothesen handelt es sich dabei um mehrere Hormone, die konzertiert zusammenwirken (Bernier et al. (1993)) oder es wird ein Blühhemmstoff abgebaut. Die Vorgänge sind komplex und man beginnt erst



Abbildung 13.11: Im Blatt wird das photoperiodische Signal der Umwelt (der Licht-Dunkel-Wechsel) über Photorezeptoren wahrgenommen. In einem Zeitmeßsystem (circadiane Uhr) wird die Tageslänge (Nachtlänge) ermittelt. Bei geeigneter Länge (zum Beispiel Kurztag bei Kurztagpflanzen) findet photoperiodische Induktion im Blatt statt. Ein Signal wird gebildet und (gestrichelte Linie) zum Apex transportiert. Es stimmt den Apex um: statt vegetativem Wachstum kommt es zur Blütenbildung ('Evokation'). Dabei spielen homeotische Gene, 'Floral Identity Gene' und Blühzeit-Gene eine Rolle. Der Apex differenziert sich zu einer Blüte oder einem Blütenstand und die Blüte(n) entwickelt sich. Nach Bernier (1971). E184/pp-bluete

jetzt, mit Mutanten mehr Licht in sie zu bringen (siehe Seite 255).

Gibt es ein universelles Blühhormon? Dafür sprechen folgende Befunde:

- Wird eine photoperiodisch reagierende Pflanze in nicht-induktiven Bedingungen gehalten und nur ein Blatt oder wenige Blätter photoperiodisch behandelt, kommt die Pflanze zum Blühen (Zeevaart (1984)).
- Wird ein Spross oder Blatt photoperiodisch induziert und auf eine nichtinduzierte Pflanze unter nicht-induktiven Bedingungen gepfropft, wird Blühen induziert.
- Wird ein Blatt photoperiodisch induziert und auf eine Pflanze gepfropft, die photoperiodisch unempfindlich ist, kommt diese verfrüht zum Blühen (Lang (1977)).
- Auch Pfropfungen zwischen photoperiodisch unempfindlichen Pflanzen führen zu verfrühter Blühinduktion des Empfängers (McDaniel and et al. (1996)).
- Pfropfungen zwischen Arten und Gattungen können ebenfalls Blütenbildung unter nicht-induktiven photoperiodischen Bedingungen im Rezeptor bewirken, wenn der Donor photoperiodisch induziert wurde.

So wurde die Kurztagpflanze Xanthium auf die Langtagpflanzen Rudbeckia, Erigeron und Centaurea gepfropft und brachte diese erfolgreich zum Blühen (Abbildung 13.12). Das gleiche wurde beim Pfropfen der Kurztagpflanze Nicotiana auf die Langtagpflanze Hyoscyamus und beim Pfropfen der Langtagpflanze Sedum auf die Kurztagpflanze Kalanchoe gefunden (Lang



Abbildung 13.12: Pfropfen eines photoperiodisch induzierten Kurztag-Reises der Kurztagpflanze Xanthium auf eine nichtinduzierte Langtag-Wirtspflanze Rudbecki induziert Blüten. Nach Okuda (1953). E187/bluehinduktion-pfropfen

and Melchers (1948)). Es gibt aber auch Gegenbeispiele (*Cestrum diurnum* auf *Cestrum nocturnum*, *Phaseolus* auf Soja) Evans (1969)).

Nach dem von Sachs (1865) und Chailakhyan (1936a) geforderten Blühhormon wurde intensiv gesucht. Trotz zahlreicher und langjähriger Untersuchungen haben diese physiologischen Untersuchungen bisher keine überzeugenden Fortschritte gebracht. Viele Fragen bleiben unbeantwortet wie: Welche Gene sind an der Blühinduktion beteiligt? Welche Signale benutzt die Pflanze für die Blühinduktion?

Neuere Untersuchungen mit Mutanten scheinen erfolgversprechender zu sein (siehe Minireview von Aukerman and Amasino (1996) und Seite 255).

Beim Mais wurde kürzlich ein Gen gefunden, das bei der Produktion oder dem Transport eines Blühsignals beteiligt ist (Colasanti and Sundaresan (2000)). ID1 (INDETERMINATE1) schaltet beim Mais von einem indeterminierten (vegetativen) zu einem determinierten Zustand (reproduktiv). Bei der Mutante id1 bleibt das Sproßende viel länger vegetativ (undeterminiert) als beim Wildtyp. Zwar bilden sich auch bei der Mutante schließlich Infloreszenzen. Sie zeigen aber vegetative Eigenschaften. ID1 wird also für den Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum benötigt. Es findet sich nur in den Blättern und nicht in dem aktiven Meristem des Sprosses (dort, wo die Blüten gebildet werden). SD1 ist also ein Teil des Signals, welches vom Blatt zum Apex gelangt. Nur reife Blätter exprimieren ID1. Chimären für ID1 blühen früher als die id1-Mutante, obwohl die aktiven Meristeme dieser Chimären mutiert waren. ID1 wirkt also nicht Zell-autonom, sondern ist an der Übertragung des Signals vom Blatt beteiligt, das im Meristem die Umstimmung bewirkt.

Es wäre interessant, herauszufinden, ob in id1-Mutanten auch andere molekulare Unterschiede zum Wildtyp zu finden sind. Die Blühkontrollierenden Signale könnten durchaus aus fördernden **und** hemmenden Komponenten bestehen.

#### Transport des Florigens

Anschließend werden die Blüh-induzierenden Substanzen zum Apex transportiert. Es ist nicht bekannt, ob diese bei Kurztagpflanzen und Langtagpflanzen gleich sind. Möglicherweise handelt es sich dabei um Organ-bildende Substanzen (Inducer, Sachs (1880)) oder Stoffe, die Blühgene anstellen (Zeevaart (1984)). Beim Mais könnte ID1-mRNA oder -Protein als Blühsignal im Leitsystem der Pflanzen von Zelle zu Zelle übertragen werden. Oder aber ID1 aktiviert andere Gene, die dann Signale der Blätter exprimieren (siehe Seite 255).

#### Umstimmung des Apex

Beim Umstimmen des Meristems des Apex spielen Floral Meristem Idendity-Gene (Okamuro et al. (1993)) und Blühzeit-Gene (R et al. (1997)) eine Rolle. Auf jeden Fall ändert sich der Stoffwechsel im Meristem des Apex. Innerhalb von Stunden nach der Translokation hat sich das Differenzierungsmuster am Apex geändert. Er ist jetzt stabil auf Blütenbildung determiniert ('Evokation') (Apex-Unterschiede nach photoperiodischer Induktion siehe Abbildung 13.13).

#### Blütenbildung

Danach wird der Apex sich zu einer Blüte differenzieren und diese sich entwickeln. Abbildung 13.13 zeigt die Unterschiede im photoperiodisch induktiven Kurztag und nichtinduktiven Langtag an Hand von makroskopischen (oben) und mikroskopischen (Mitte, unten) Bildern des vegetativen (links) und reproduktiven (rechts) Apex von *Pharbitis nil*.

# Beispiele für Kurztagspflanzen: Pharbitis nil

Im folgenden werden einige Beispiele für Kurzund Langtagpflanzen vorgestellt. Sie wurden und werden bei photoperiodischen Untersuchungen häufig verwendet, weil sie gewisse Vorteile haben. Darüber mehr bei den einzelnen Beispielen.

Die Kaiserwinde *Pharbitis nil* (Abbildung 13.14) kann bereits durch einen einzigen Kurztag zum Blühen gebracht werden (Abbildung 13.15). Außerdem kann man zum Induzieren bereits sehr junge Pflanzen im Keimlingsstadium verwenden. Die Umstimmungen am Apex lassen sich unter dem Binokular schon wenige Tage nach der Induktion erkennen. Auf diese Weise können Versuche in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden. Für besondere Fälle sind aber auch ältere Pflanzen geeignet. So zeigen Folgeblätter eine tagesperiodische Bewegung,



Abbildung 13.13: Entwicklung des Apex von *Pharbitis nil* unter nicht-induktiver Photoperiode (Langtag, links) und nach photoperiodischer Induktion durch Kurztag (rechts). Die Unterschiede werden an Hand von makroskopischen (oben) und mikroskopischen (Mitte, unten) Bildern des Apex verdeutlicht. Nach Imamura and Marushige (1967). 186/bluetenentwicklung



Abbildung 13.14: Kaiserwinde *Pharbitis nil.* Links vegetative Pflanze im Langtag, rechts blühende Pflanze im Kurztag. 188/pharbitis

die bei Keimblättern fehlt. Damit können photoperiodische Blühinduktion und tagesperiodische Vorgänge parallel untersucht werden (Bollig (1975)). Näheres zur Anzucht in Engelmann and Klemke (1983). Die Blühreaktion wird bei *Pharbitis* gemessen, indem der Prozentsatz blühender Pflanzen, der Prozentsatz von Pflanzen mit Terminalblüten oder die mittlere Zahl der Blütenknospen pro Pflanze bestimmt wird.

Die anatomischen Veränderungen des Apex Im Langtag und nach der Induktion der Blüten durch Kurztag sind in Abbildung 13.16 dargestellt.

Die Stämme von *Pharbitis nil* sind je nach der geographischen Breite, in der sie vorkommen, unterschiedlich empfindlich (Abbildung 13.17). Das hängt davon ab, wie viel Blühhormon in den Blättern gebildet wird und wie empfindlich der Apex auf das Blühhormon reagiert. Bei *Pharbitis nil* Stamm violet induziert ein einziger Kurztag mit einer 16 stündigen Dunkel-



Abbildung 13.16: Anatomische Veränderungen des jungen Apex nach Langtag (adulter vegetativer Apex) und nach Kurztag (Blütenapex). Nach Imamura and Marushige (1967). E190vz/pharbitis-apex



Abbildung 13.15: Wirkung einer unterschiedlich langen Licht- bzw. Dunkelperiode auf die Induktion der Blütenbildung der Kaiserwinde *Pharbitis nil.* Nach Takimoto and Hamner (1964). D189/pharbitis-bluehinduktion



Abbildung 13.17: Blühreaktion auf verschiedene Zahl von 8:16-stündigen Kurztagen (x-Achse) von fünf Varietäten (Violet, Shifukurin, Kidachi, Nepal, Africa) von *Pharbitis nil*. Nach Imamura et al. (1966). D191/pharbitis-stämme

periode die Blütenbildung. Auch kürzere Dunkelperioden induzieren. Die kritische Dunkelperiode beträgt für Keimlinge 9-10 h, für ältere Pflanzen 8-9 h.

Die Physiologie der Blühinduktion bei *Pharbitis* ist zusammenfassend von Takimoto in Evans (1969) und Imamura (1967) beschrieben worden. Lumsden hat diese Pflanze in den letzten Jahren intensiv untersucht (Lumsden (1998)). Bei der Induktion der Blütenbildung durch Kurztag spielt die Dunkelperiode die entscheidende Rolle. Aber die Länge der Lichtperiode vor der Dunkelperiode, die Intensität des Lichtes und seine Wellenlänge beeinflussen ebenfalls die Blühinduktion. Ferner ist das Alter der Pflanzen von Bedeutung: Mit zunehmendem Alter blühen die Pflanzen leichter.

Wie auch bei anderen photoperiodisch reagierenden Pflanzen ist die Induktion *per se* immer noch nicht verstanden: Welches Signal wird photoperiodisch im Blatt induziert und von dort zum Apex transportiert?

Als allgemeines Modell wird für die Induktion vorgeschlagen, dass Photorezeptoren das Licht wahrnehmen und nach Änderungen im Photorezeptor photoperiodische Signale in einem Zeitmess-System verarbeitet werden (siehe Abbildung 13.18). Dabei spielt ein photoperiodischer Response Rhythmus (PPRR) eine wichtige Rolle, der Eingänge hat, synchronisierbar ist, Ausgänge besitzt und mit anderen Vorgängen gekoppelt sein kann. Ein externes Koinzidenzmodell (siehe 'Modelle', Unterabschnitt 13.3.15 und Abbildung 20.23) wird favorisiert.

Als Photorezeptor fungiert Phytochrom oder mehrere Phytochromarten (siehe 20.13). Licht stellt die Phase des Oszillators ein und es hat eine akute Wirkung auf den photoperiodischen Vorgang. Die beiden Wirkungen des Lichtes lassen sich durch unterschiedliche Dosis-Effekt-Kurven trennen (Abbildung13.19).

Um zu verstehen, was bei der Blühinduktion



Abbildung 13.18: Modell für die photoperiodische Induktion von Blüten: Photorezeptoren nehmen das Licht wahr. Nach Änderungen im Photorezeptor entsteht ein photoperiodisches Signal. Es wird in einem Zeitmess-System verarbeitet. Je nach dem Ergebnis dieser Verarbeitung kommt es zu physiologischen Folgeprozessen, nämlich einem photoperiodischen Response Rhythmus (PPRR), der einen Schalter so beeinflusst, dass es entweder zur Blühinduktion oder zu vegetativem Wachstum kommt. E190Av/pp-schema-organismus

durch die Dunkelperiode in den Blättern molekularbiologisch passiert, wurden eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt (King et al. (1968)). Auch die Ereignisse nach der Induktion, wenn das induktive Signal zum Apex transportiert wird, wurden untersucht (Zeevaart and Marushige (1967)). Ferner war Ziel von Experimenten, die Wirkung von Hormonen auf die Blühinduktion von *Pharbitis nil* zu ermitteln (Ogawa and Zeevaart (1967)).

Photoperiodische Experimente an *Pharbitis nil* sind in einem Praktikumsbuch (Engelmann (1999)) beschrieben.

#### Beispiele für Kurztagspflanzen: Chenopodium rubrum

Chenopodium rubrum ist eine Ruderalpflanze, die sehr schnell zur Blütenbildung kommt. Sie wächst an feuchten und zum Teil auch salzigen Stellen. Als 'Bauchpflanze' (die man nur sieht, wenn man auf dem Bauch liegt, Schröter (n.d.)) lässt sie sich für Untersuchungen auch in Petrischalen anziehen, photoperiodisch induzieren und auswerten (Abbildung 13.20). Ein Stamm vom Yukonfluß in Alaska kann bereits im Keimlingsstadium durch einen einzigen Kurztag zum Blühen induziert werden (Abbildung 13.21, Cumming (1967)). Ob die Induktion erfolgreich war, lässt sich schon einen Tag nach der Induktion feststellen. Mit *Chenopodium rubrum* lassen sich leicht photoperiodische Versuche in Praktika und Schulen durchführen (Engelmann (1999)).

Es wurde vermutet, dass der Blühimpuls elektrischer Natur sein könnte. Das konnte aber in neueren Untersuchungen nicht bestätigt werden (Adamec and Krekule (1989), ?). Demnach ist der Blühimpuls eher chemischer Natur.

#### Beispiele für Langtagpflanzen

Zu den Langtagpflanzen gehören Hyoscyamus niger, Arabidopsis thaliana, Avena sativa (Frühjahrssorten), Lemna gibba G3, Nicotiana silvestris, Rudbeckia hirta, Sedum spectabile, Sinapis alba und Trifolium pratense. Quantitative Langtagpflanzen sind Brassica campestris und rapa c.v Ceves, Hordeum vulgare, Lolium temulentum, Secale cereale (Frühlingsformen), Oenothera rosea und Trifolium pratense cv Americ. Medium.

Die Zahl induktiver Zyklen für Blühinduktion ist unterschiedlich: Durch einen einzigen Langtag werden Anagallis arvensis, Sinapis alba, Brassica campestris cv Ceves, Lemna gibba und Lolium temulentum zur Blütenbildung induziert. Zwei bis drei Tage braucht Hyoscyamus



Abbildung 13.21: Abhängigkeit der photoperiodischen Blühinduktion von der Tageslänge bei 6 verschiedenen *Chenopodium rubrum* Stämmen von unterschiedlichen geographischen Breiten. Nach Cumming (1967). D194/blühinduktion-chenopodium

niger, 4 Tage Arabidopsis thaliana und 6 Tage Silene armeria.

Wir werden näher auf den Photoperiodismus der Blühinduktion der Langtagpflanze Arabidopsis thaliana eingehen.

#### Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana wurde 1905 von Laibach (siehe Laibach (1943)) als geeignetes Untersuchungsobjekt in die Botanik eingeführt (Napp-Zinn (1969)). Diese Pflanze hat eine Reihe von Vorteilen, vor allem eine kurze Generationszeit von nur 3 Wochen. Arabidopsis thaliana ist klein und anspruchslos, hat ein kleines Genom und ist Selbstbestäuber.

Arabidopsis thaliana ist eine fakultative Langtagpflanze: Langtag beschleunigt das Blühen, Kurztag verzögert es, kann aber das Blühen nicht unterbinden (Abbildung 13.22). Es gibt verschiedene Rassen, deren photoperiodische Reaktionen auf Langtag sich unterscheiden. Es gibt frühe, mittlere und späte Sommer-Einjährige und Winter-Einjährige. Die frühesten (Wa) blühen bereits 11 Tage nach der Keimung, die spätesten 112 Tage danach. Für die Induktion der Blütenbildung genügen 4 Tage Dauerlicht. Die kritische Tageslänge beträgt für Wa nur 4 h, für Gr 5 h. Blaulicht ist für die photoperiodische Reaktion nötig. Um den photoperiodischen Effekt zu messen, kann die Sichtbarkeit der ersten Blütenprimordien, die Zeit des Öffnens der ersten Blüten oder die Zahl der Rosetten- und Stängelblätter benutzt werden.

Während physiologische Studien an dieser Pflanze bisher nicht besonders gut geholfen haben, die Vorgänge bei der Induktion der Blütenbildung zu verstehen, sind Mutanten und molekularbiologische Untersuchungen in neuester Zeit sehr hilfreich gewesen. Für Zusammenfassungen siehe Coupland (1998), Koorneef et al. (1998a), Simpson et al. (1999), Putterill (2001). Es gibt eine ganze Reihe von Mutanten, in denen die photoperiodische Reaktion





Abbildung 13.20: Apex von *Chenopodium rubrum* im vegetativen (links, im Langtag gehalten, mit Blattprimordien und Achselknospenprimordien) und im reproduktiven Zustand (rechts, im Kurztag gehalten, ovarielle Primordien, Antherenprimordien, Perianthprimordien, Blattanlagen) von oben gesehen. Skala 0.1 mm. Nach Cumming (1967). 193/chenopodium

Abbildung 13.19: Licht hat eine Doppelwirkung: Es stellt (1) die Phase des Oszillators ( $\tilde{}$ ), der an den photoperiodischen Rhythmus gekoppelt ist, und es hat (2) eine akute Wirkung auf den photoperiodischen Vorgang, indem es mit einer Licht-empfindlichen Phase interferiert (rote Kreise). Die beiden Wirkungen des Lichtes zeigen sich durch unterschiedliche Dosis-Effekt-Kurven. Nach Lumsden (1998). E192/doppelwirkung-licht-pharbitis



Abbildung 13.22: Arabidopsis als fakultative Langtagpflanze. 195/ltp-arabidopsis

von Arabidopsis thaliana geändert ist. Über 80 Gene beeinflussen die Blühzeit (flowering time genes). Andere betreffen die Photorezeptoren des photoperiodischen Reizes. So wurden einige Gene identifiziert, die durch Blaulicht aktiviert werden und auf dem Weg zur Blühinduktion das morphogenetische Programm starten (Kaldenhoff et al. (1993)). Außerdem gibt es Mutanten, bei denen die Übertragung des Signals beeinflusst ist. das den photoperiodischen Reiz nach der Perzeption weiterleitet.

Es hat sich folgendes Bild ergeben, das sich sicherlich noch im Einzelnen ändern wird: Bei Arabidopsis thaliana wird der Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum durch verschiedene Faktoren verzögert. Auf diese Weise erreicht die Pflanze eine gewisse Größe, bevor sie Blüten bildet. Zu diesen Faktoren gehört EMF1 und EMF2. Die Mutanten emf1 und emf2 beginnen schon sehr früh zu blühen. Die normale Hemmung der Blütenbildung wird durch drei Wege aufgehoben: ein autonomer Weg, ein Langtag-Weg, und ein Gibberellinsäure-Weg (Abbildung 13.23). Bei einigen Stämmen ist ein vierter Weg beteiligt, nämlich Vernalisation. Eine längere Periode niedriger Temperatur während des Winters ist nötig, damit die Pflanzen im nächsten blühen.

Es gibt also eine Redundanz von Wegen und Genen, die die Blühinduktion steuern (die Repression des Blühens aufheben). Der autonome Weg wird eingeschlagen, wenn lange Zeit Kurztag herrscht. Er führt dann trotz ungünstiger photoperiodischer Bedingungen zum Blühen, wenn die Pflanzen alt genug sind. Die Redundanz ist wohl auch der Grund, warum man keine Mutante gefunden hat, die im Kurztag nie blüht. Der Gibberrelinsäure-Weg kommt zum Tragen, wenn Arabidopsis thaliana unter Kurztagbedingungen stehen- Gibberrelinsäure ist dann zum Blühen nötig. Der Langtag-Weg wird eingeschlagen, wenn die Pflanzen in Langtag kommen. Den bisher bekannten Mutanten, die diesen Weg beeinträchtigen, fehlen Gene, die beim Übertragen des photoperiodischen Signals eine Rolle spielen. Wie diese zwischen der Aufnahme des photoperiodischen Reizes und der photoperiodischen Reaktion, nämlich der Umstimmung zum Blühen, angeordnet sind, zeigt Abbildung 13.24.

die wahrgenommen Wie Tageslänge Verschiedene Modelle in Abschnitt wird: 20.18 diskutieren, wie die Photoperiode durch Organismen gemessen wird. Die wichtigsten sind das externe und das interne Koinzidenmodell. In beiden wird angenommen, dass circadiane Uhren bei der Tageslängenmessung beteiligt sind. Allerdings sind bei Langtagpflanzen auch die Dauer, Intensität und Wellenlänge des Lichtes für die Blühinduktion wichtig. Ein abgewandeltes externes Koinzidenzmodell wurde für Langtagpflanzen vorgeschlagen. Der Licht-Dunkel-Wechsel interagiert direkt oder indirekt mit einem internen Rhythmus der Dunkelrot-Empfindlichkeit oder verschiebt dessen Phase. Dadurch fallen maximale Dunkelrotempfindlichkeit und Lichtperiode zusammen und Blühen wird gefördert (Goto et al. (1991), Thomas and Vince-Prue (1997)).

Mutanten, die die Perzeption des Lichtes beeinflussen, wurden untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Arabidopsis Phytochrome und Cryptochrome daran beteiligt sind, die photoperiodische Umwelt zu erkennen. CRY2 scheint Blühen zu fördern, PHYB zu hemmen (Übersicht: Linxxx (2000)). Somit fördern Dunkelrot und blaues Licht die Blühinduktion, während Rotlicht hemmt. CRY2 könnte Blühen fördern, indem es die hemmende Wirkung des PHYB im Rotlicht aufhebt. Auch PHYA ist an der photoperiodischen Blühinduktion beteiligt. Es könnte direkt die Expression oder Aktivität von Genen beeinflussen, die mit der Blühzeit zu tun haben, oder die Phase der circadianen



inhibition of flowering

Abbildung 13.23: Schema der verschiedenen Wege, mit denen bei Arabidopsis thaliana die Hemmung der Blühinduktion aufgehoben werden kann: ein autonomer Weg, ein Langtag-Weg, und ein Gibberellinsäure-Weg. Nach Coupland (1998) auf Grund von Vorschlägen von Koorneef et al. (1998a), Koorneef et al. (1998b) und Martinez-Zapater et al. (1998). E196/bluehschema



Abbildung 13.24: Modell der Interaktionen von Genen, die das Blühen von Arabidopsis im Langtag fördern. Mutationen in FHA, LHY, GI, CO und FT-Genen verzögern das Blühen im Langtag. Das FHA Gen kodiert einen Blaulicht-Rezeptor und wirkt am Anfang des photoperiodisch induzierenden Vorgangs. Fehlt LHY, fällt der circadiane Rhythmus aus. Das Gen wird demnach für das Funktionieren der circadianen Uhr benötigt. Im Langtag wird mehr CO gebildet und dadurch Gene wie LFY aktiviert, die für die Blütenentwicklung wichtig sind. GI liegt im gleichen Pfad und oberhalb von CO. Auch FT liegt auf dem Langtag-Weg, aber auf einem Nebenpfad, durch den andere Gene der Blütenentwicklung als LFY aktiviert werden. Nach Coupland (1998). E197/bluehfaktoren
#### Uhr verschieben.

Neben Mutanten, bei denen die Funktion der Photorezeptoren betroffen ist, sind auch solche bekannt, bei denen die *Weiterleitung* der durch das Licht bedingten Signale verändert ist. Solche Mutanten sind sowohl für das Phytochrom (siehe Abschnitt 20.13) als auch für den Blaulichtrezeptor bekannt.

Letztlich werden durch alle diese Pfade die *floral identity genes* hochreguliert, die für die Entwicklung der Blüten benötigt werden.

Die meisten Mutanten, bei denen die Blühzeit gegenüber dem Wildtyp geändert ist, deren photoperiodische Reaktion also anormal ist, haben einen normalen circadianen Rhythmus. Es gibt aber drei Mutanten, bei denen auch die circadiane Uhr beeinflusst ist: die Mutante esd4 (kürzere Periode, Simon et al. (1996)), elf3 (arrhythmisch, Zagotta et al. (1996)) und lhy (arrhythmisch, unveröffentlicht). Als Zeiger für die circadiane Uhr wurde die Blattbewegung benutzt und ein Luciferase-Konstrukt (CAB:LUC), das der Pflanze ein periodisches Leuchten vermittelt. Obwohl elf3 und lhy beide arrhythmisch sind, blüht erstere früher (auch im Kurztag), letztere später. Es ist also kein direkter Zusammenhang zwischen der circadianen Uhr und der photoperiodischen Anormalität (Arrhythmie) zu beobachten (Carré (1998)). Es gibt dafür verschiedene Erklärungen:

- elf3 wirkt nicht direkt auf die circadiane Uhr, sondern auf den Eingang Lichtsignal-Uhr. Es ist bekannt (phyB), dass Änderungen im Lichttransduktionsweg das Blühen beschleunigen können. Es würde sich also um eine Wirkung handeln, die unabhängig ist von der auf den circadianen Rhythmus.
- 2. da die Uhr von elf3 im Licht-Dunkel-Wechsel noch funktioniert, könnte sie unterschiedlich auf Licht empfindlich sein

und damit auch die photoperiodische Zeitmessung geändert sein.

3. elf3 und lhy stoppen beide die Uhr, aber zu unterschiedlichen Phasen. Bei elf3 ist sie in einer Phase gestoppt, in der die photoperiodische Reaktion gerade Licht-empfindlich ist. Es kommt zu einer verfrühten Blütenbildung, weil ja diese Phase dauernd anhält. Bei lhy dagegen ist die Uhr in einer Phase gestoppt, in der das photoperiodische System nicht Licht-empfindlich ist. Es kommt deshalb zu einem verspäteten Blühen.

Um die photoperiodische Kontrolle des Blühens bei Arabidopsis thaliana besser zu verstehen, müssten durch Mutanten die beiden anderen Wege zur Unterdrückung der Blühinduktion, der GA-Weg und der autonome Weg, ausgeschaltet werden (zum Beispiel durch eine Doppelmutante ga1;fca). Dann bliebe nur noch der Langtag-Weg übrig, und man könnte jetzt gezielt nach Mutanten suchen, die in diesem Weg eingreifen. Es müsste dann bestimmt werden, an welchen Stellen die so gefundenen Mutationen eingreifen (siehe die Abbildung 13.24). Außerdem müsste festgestellt werden, wo die so gefundenen Gene in der Pflanze funktionieren. Das lässt sich durch genetische Sektoren in transgenen Pflanzen oder in bestrahlten Pflanzen erreichen (Furner (1996)).

# 13.3 Diapause

Beschwerde-Kasten: Dieser Abschnitt ist meiner Meinung nach zu lang. Ich weiss auch, dass David Saunders an einer Neuauflage seines Buches 'Insect clocks' arbeitet. Ich sollte bei vielen der folgenden Beispiele darauf verweisen.

Photoperiodischen Wirkungen sind auch bei Insekten weit verbreitet. Das Wachstum, die Entwicklung, die Gestalt (Morphen) und das Verhalten der Tiere (zum Beispiel Wanderungen) werden beeinflusst. Besonders gut untersucht sind photoperiodische Unterbrechungen der Entwicklung. In diesem 'Diapause'-Zustand können ungünstige Bedingungen wie niedrige Temperatur und Trockenheit besser überdauert werden. Zwar gibt es eine ganze Reihe von Umweltfaktoren wie Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Qualität des Futters, die ungünstige Jahreszeiten ankündigen. Aber die Photoperiode ist der zuverlässigste und genaueste Informant und wird deshalb auch von vielen Insekten als Jahreskalender benutzt. Bereits 10 bis 15 Minuten Unterschied in der Tageslänge kann darüber entscheiden, ob Diapause eintritt oder die Entwicklung weitergeht. Wie die Tageslänge gemessen wird, ist in verschiedenen Modellen vorgeschlagen worden 13.3.15.

Wir werden Beispiele kennen lernen, wie bei Insekten die Entwicklung photoperiodisch kontrolliert wird. Diapause kann in allen Stadien eines Insekts auftreten, also im Ei-, Larven-, Puppen- und Adultstadium. Sie ist aber Artspezifisch, also genetisch kontrolliert. Die dabei von den Insekten benutzten Photorezeptoren sind in einigen Fällen bekannt. Wie die Entwicklung durch Diapause unterbrochen wird und welche physiologischen und neuroendokrinen Mechanismen dabei beteiligt sind, ist ebenfalls in einigen Fällen untersucht.

Während der Diapause ist der Stoffwechsel niedrig, der Wassergehalt gering, das Verhalten geändert und die Spermatogenese und Vitellogenese gedrosselt. Im Unterschied zur Diapause ist die *Quieszenz* eine unmittelbare Reaktion auf ungünstige Bedingungen. Sie wird wieder beendet, sobald die Bedingungen günstig sind. Ein Beispiel für Quieszenz bietet die Chironomide *Polypedilum vanderplanki*. Die Larven leben in Wasseransammlungen von exponierten Felsen in Teilen West- und Ostafrikas. Während der Trockenzeit trocknen die Vertiefungen aus und die Larven dehydrieren fast völlig (Hinton (1953)). Sie können aber in diesem Zustand über viele Jahre überleben und alle möglichen brutalen Behandlungen ertragen wie kurze Erhitzung auf etwas über 100<sup>0</sup>C, flüssiges Helium, einen Tag absoluten Alkohol, eine Woche reines Glycerol.

Mehr Informationen zur Diapause in SAUN-DERS (1982).

# 13.3.1 Kannenpflanzen-Zuckmücken

Die 'pitcher plant midge' Metriocnemus knabi gehört zu den Chironomiden. Ihre Larven leben im Wasser der Blätter der Kannenpflanzen Saracenia purpurea in Mooren der nördlichen Staaten der USA und von Kanada. Die Kannen haben glatte Wände und sind im unteren Teil mit Wasser gefüllt. Insekten, die hineinfallen, ertrinken und dienen der Pflanze als Stickstoffquelle und den Larven als Nahrung.

Die Kannenpflanzen-Zuckmücke durchläuft vier Larvenstadien in der Flüssigkeit der Kannen. Nach etwa 4 Wochen (bei 23<sup>0</sup>C) bilden die Vorpuppen einen gelatineartigen Kokon, eine Art Puppenwiege, dicht über der Wasseroberfläche an der Innenseite der Kannen. In diesem Kokon wird die Puppe gebildet. Nach 2-3 Tagen (23<sup>0</sup>C) schlüpfen die Imagines. Sie sind beflügelt, paaren sich und die Weibchen legen ihre Eier als Paket auf die Wasseroberfläche in den Kannen ab (Abbildung 13.25).

In Mooren und Sümpfen Michigans und anderer Staaten der USA und Kanadas findet man pitcher plants. Ihre Blätter sind Kannen-artig und teilweise mit Wasser gefüllt. Leert man den Inhalt eines solchen Blattes in eine flache Schale, sieht man sofort, warum sie diesen seltsamen Namen bekommen haben: In der Flüssigkeit sind hunderte ertrunkener Insekten



Abbildung 13.25: Die Larven der Kannenpflanzenmücke *Metriocnemus knabi* leben im Wasser der Blätter der Kannenpflanzen *Saracenia purpurea*. Nach vier Larvenstadien in der Flüssigkeit der Kannen bilden die Vorpuppen einen gelatineartigen Kokon dicht über der Wasseroberfläche an der Innenseite der Kannen. In ihm wird die Puppe gebildet. Nach 2-3 Tagen (23<sup>o</sup>C) schlüpfen die Imagines. Sie sind beflügelt, paaren sich und die Weibchen legen ihre Eier als Paket auf die Wasseroberfläche in den Kannen ab. Nach Paris and Jenner (1959). E219/Metriocnemus

oder Teile von ihnen. Wenn wir ein Blatt aufschneiden und uns die innere Oberfläche genauer ansehen, erkennen wir Zellen, deren Kutikula Dachziegel-artig die darunter liegenden Zellen überdecken. Außerdem ist die Kutikula glatt. Es ist ein idealer Mechanismus, um zu verhindern, dass die Insekten und anderen kleinen Tiere wieder aus der Kannenfalle herauskommen, nachdem sie hineingefallen sind. (Abbildung 13.25). Sie ertrinken schließlich, zerfallen und dienen der Pflanze als Stickstoffquelle. Stickstoff ist in diesem Biotop knapp.

Mit etwas Glück findet man Larven der 'pitcher plant Mücken', zum Beispiel die der Art *Metriocnemus knabi.* Sie gehören zu den Chironomiden. Sie leben im Wasser der Kannen und ernähren sich von den ertrunkenen Tiere. Sie durchlaufen vier Larvenstadien in der Flüssigkeit der Kannen. Nach etwa vier Wochen (bei 23<sup>0</sup>C) bilden die Vorpuppen einen gelatineartigen Kokon, eine Art Puppenwiege, dicht über der Wasseroberfläche an der Innenseite der Kannen. In ihm wird die Puppe gebildet. Nach 2-3 Tagen (23<sup>0</sup>C) schlüpfen die Imagines. Sie sind beflügelt, paaren sich und die Weibchen legen ihre Eier als Paket auf die Wasseroberfläche in den Kannen ab (Abbildung 13.25). Ab September  $(35^{0}N)$  werden keine Vorpuppen mehr gebildet. Stattdessen gehen die Tiere im letzten (vierten) Larvenstadium im Wasser der Kannenblätter in Diapause über. Der Stoffwechsel wird abgesenkt und die Larven werden frostresistent. Ab Februar/März wird die Diapause beendet (Abbildung 13.26). Die Tiere kriechen aus dem Wasser und verpuppen sich an den Innenwänden der Kannen. Nach der Metamorphose schlüpfen die Adulttiere, paaren sich, legen Eier ab und der Entwicklungszyklus beginnt von neuem. Im Sommer gibt es keine Diapause: Die Larven verpuppen sich ohne Entwicklungsstop.

Bei diesem Insekt wird die Diapause pho-



Abbildung 13.26: Ab Ende Februar/Anfang März werden im Freiland die ersten Puppen beobachtet (A mit senkrechter Markierung). Das ist also der Termin, zu dem die Diapause beendet wird. Puppen finden sich noch bis Mitte September (B mit senkrechter Markierung). Ende September (C mit senkrechter Markierung) wurden keine Puppen mehr beobachtet. Zwischen B und C liegt also der Zeitpunkt, zu dem die Diapause stattfindet. Nach Paris and Jenner (1959). D220/Metriocnemus-tageslänge

toperiodisch induziert und beendet. Die kritische Tageslänge liegt bei 13.5 Stunden (Abbildung 13.27, Paris and Jenner (1959)). Sie ist temperaturunabhängig. 10 bis 14 induzierende Kurztage sind nötig. Die photoperiodische Lichtempfindlichkeit der Tiere ist extrem groß: 0.00025 Lux wirken noch induzierend. Wahrscheinlich ist das eine Anpassung an die Lichtarme Umgebung im Inneren der Kannenblätter, die noch zusätzlich durch einen Blattdeckel überdeckt werden und von Sphagnum Moosen und anderen Pflanzen umgeben sind. Diapause bei anderen Kannenpflanzen-Mücken wurde von Bradshaw und Mitarbeitern (Bradshaw (1972), Bradshaw and Lounibos (1972), Bradshaw and Lounibos (1972), Hard et al. (1993)) untersucht. Zahlreiche andere Beispie-



Abbildung 13.27: Photoperiodische Reaktion bei *Metriocnemus*] Im Labor wurde untersucht, wie die Puppenbildung (also keine Diapause) von der Tageslänge abhängt. Nach 40 Tagen waren bei 12 Stunden Lichtperiode noch alle Tiere in Diapause, bei 13 Stunden waren alle Tiere verpuppt (Diapause gebrochen). Die kritische Tageslänge liegt also zwischen 12 und 13 Stunden. Nach Paris and Jenner (1959). D221/Metriocnemus-diapause le für Diapause könnten gegeben werden. Um zu vermeiden, dass das Buch zu dick wird und der Leser nicht mehr weiter liest, werden nur ein paar weitere Beispiele unter verschiedenem Gesichtswinkel gebracht. Für spezielle Literatur siehe Saunders (1982), Beck (1980), Lees (1955), Lofts (1970), Tauber and Kyriacou (2001); Veerman (1985) und Kroon (1998) über Spinnmilben.

# 13.3.2 Photoperiodismus und Polymorphismus bei Blattläusen (*Hemiptera*)

Blattläuse gehören zur Ordnung der Schnabelkerfe (Hemiptera), der Überfamilie der Aphidoidea und der Familie der Aphididae (Blattläuse im engeren Sinn). Sie finden sich vor allem in den gemäßigten Breiten. Sie sind klein, unansehnlich und haben eine hohe Individuendichte (bis zu 50 000 Tiere pro Hektar). Kulturpflanzen und Bäume können durch den Massenbefall geschädigt werden. Es gibt mehrere Generationen pro Jahr mit einem komplizierten Entwicklungszyklus. Die hemimetabolen Tiere häuten sich vier mal. Die Weibchen sind vivipar (lebendgebärend, wobei die Larven bereits im Mutterleib aus den Eischalen schlüpfen) und in einigen Generationen parthenogenetisch (aber diploid). Es treten mehrere Morphen auf, geflügelte (Alatae) und ungeflügelte (Apterae): Sie zeigen Polymorphismus.

Wir wollen uns den gesamten Generationszyklus ansehen (Abbildung 13.28). Im Kurztag des Herbstes treten 'Sexuales' auf mit Männchen und oviparen Weibchen, die Eier ablegen. Diese überwintern. Im Frühjahr schlüpfen Larven und entwickeln sich zur Fundatrix. Im Langtag des Sommers werden mehrere Generationen flügelllosen 'Virginoparae' gebildet. Sie pflanzen sich parthenogenetisch fort. Wenn im Herbst die Tage kürzer werden, entwickeln sich flügellose 'Oviparae' (Abbildung 13.28). Geflügelte Formen treten unter ungünstigen Bedingungen wie zum Beispiel bei Überbevölkerung oder bei gilbenden Blättern auf. Die geflügelten Formen können bis zu 1300 km Entfernungen zurücklegen.

Marcovitch (1924) entdeckte bei der Erdbeerlaus Aphis forbesi die photoperiodische Steuerung des Polymorphismus. Die Tageslänge wird über Photorezeptoren wahrgenommen, die sich im Gehirn befinden und wahrscheinlich neurosekretorische Zellen sind (Abbildung 13.29, Lees (1964)). Diese Zellen sind auch Effektoren und steuern die photoperiodische Reaktion. Das wirksamste Licht für die photoperiodische Reaktion von Megoura viciae ist blau (Wellenlängen von 440 bis 510 nm, Abbildung 13.30). Die kritische Tageslänge ist zum Teil sehr genau (10 Minuten!).



Abbildung 13.30: Aktionsspektrum der photoperiodischen Induktion bei *Megoura viciae*: Am wirksamsten ist Blaulicht (Wellenlängen von 440 bis 510 nm). Nach Lees (1981). D213/aktionsspektrum-megoura

### 13.3.3 Kartoffelkäfer

Käfer bilden die größte Ordnung der Käfer und aller Tiere überhaupt. Es gibt mindestens 500000 Arten. Nur bei 10% sind die Larvenstadien und die Lebensweise bekannt. Sie sind auf der gesamten Erde verbreitet und kommen in allen Kontinenten vor. Selbst im Wasser, auf Gletschern, in Höhlen und Wüsten findet man sie.

Der Kartoffelkäfer Leptinotarsa decemlineata hat sich erst vor etwa 120 Jahren auf die Kartoffel umgestellt. Der Kartoffelkäfer ist durch etwa 10 schwarze Längsstreifen leicht erkennbar (Abbildung 13.31). Die Weibchen legen Eier ab, aus denen sich wieder eine Generation entwickelt. Beim Welken der Blätter im Spätsommer und Frühherbst (Kurztag) werden die Adultiere negativ phototaktisch, kriechen in den Boden und machen eine Diapause durch:



Abbildung 13.31: Kartoffelkäfer *Leptinotar*sa decemlineata auf einer Kartoffelpflanze 223/kartoffelkaefer

In mehreren Untersuchungen wurden die biochemischen und hormonellen Änderungen vor und während der Diapause untersucht. Die Atmung sinkt, Fett- und Glykogenreserven steigen, die Tiere fressen nicht mehr und die Gonaden werden rückgebildet. Nach der Überwinterung kommen die Kartoffelkäfer im Frühjahr wieder an die Erdoberfläche und suchen neue Futterpflanzen. Fressen, Wachstum, Fortpflan-



Abbildung 13.28: Photoperiodische Steuerung des Generationswechsels bei der Blattlaus Megoura viciae. Aus den überwinternden Eiern der oviparen Weibchen schlüpfen im Frühjahr Larven und entwickeln sich zur 'Fundatrix'. Diese flügellosen 'Virginoparae' erzeugen im Langtag mehrere parthenogenetische Generationen von weiteren Virginoparae (rechter Teil der Abbildung). Im Kurztag werden flügellose 'Oviparae' erzeugt (linker Teil der Abbildung). Die kritische Tageslänge für diese beiden Alternativ-Reaktionen liegt bei 14 Stunden 55 Minuten. Nach Lees (1970). D212/blattlaus-zyklus



Abbildung 13.29: Photorezeptoren für die photoperiodische Kontrolle der Bildung von 'Virginoparae' im Langtag oder der 'Oviparae' im Kurztag bei *Megoura viciae*. Einzeltieren wurde zunächst ein Kurztag von 13.5 Stunden gegeben. Dieser wurde durch eine Stunde Farblicht 1.5 Stunden nach Beginn der Dunkelperiode zu einem Langtag, wenn die Wellenlänge des Lichtes photoperiodisch wirksam war. Das Zusatzlicht wurde mit einer Injektionskanüle auf verschiedene Teile des Körpers gerichtet. Die Belichtungsorte sind durch rot umrandete Kreise/Ellipsen angedeutet. Bei photoperiodisch erfolgreicher Belichtung sind diese rot ausgefüllt. Links: Bestrahlung des Vorderteils: 15 von 15 Tieren (15/15) reagierten photoperiodisch. Bestrahlung der Mitte des Abdomens: Keins von 18 Tieren reagierte photoperiodisch). Bestrahlung mit feineren Kanülen zeigt, dass nur bei Bestrahlung des Kopfteils die photoperiodische Reaktion eintritt. Rechts: Detaillierte Bestrahlung von Teilen der Kopfregion zeigt, dass das Gehirn empfindlich ist und der optische Lappen. Nach Lees (1964). E213A/megoura-pr-pp

zung und Diapause sind mit der Entwicklung der Futterpflanzen synchronisiert.

Endokrinologisch wurde gezeigt, dass Kurztag über das Gehirn die Juvenilhormonproduktion und -abgabe der *Corpora allata* hemmt (Abbildung 13.32). Diapause kann bei nichtdiapausierenden Tieren induziert werden, indem die *Corpora allata* entfernt werden. Wiedereinpflanzung der *Corpora allata* bricht die Diapause.



Abbildung 13.32: Kurztag induziert Diapause im Adultstadium des Kartoffelkäfers. Die kritische Tageslänge liegt bei einer Lichtperiode von etwa 16 Stunden. Nach DeWilde (1958). D224/kartoffelkaefer-diapause

Wegen der Schädigung im Kartoffelanbau wurde auch das Verhalten der Tiere intensiv untersucht.

Eine ganze Reihe anderer Insekten, die Schädlinge in der Landwirtschaft sind, besitzen Diapause. Um nur einige zu nennen: Die Baumwollmotte *Pectinophora gossypiella*, ein Schädling der Baumwolle, der Maiszüngler *Ostrinia nubilalis*, der 1912 von Europa nach USA gekommen ist, der Kiefernspinner *Dendrolimus pini*, ein gefürchteter Schädling von Kiefern.

#### 13.3.4 Sarcophaga

Die Fleischfliege Sarcophaga argyrostoma ist ein weiteres Beispiel für ein Insekt mit Diapause. Sie legt keine Eier ab, sondern Larven, die sich intrauterin entwickelt haben. Nach dem Schlüpfen durchlaufen sie drei Larvenstadien, verpuppen sich und beginnen die Metamorphose (Abbildung 13.33). Im Kurztag (kritische Tageslänge 14.5 bis 15 Stunden) wird die Entwicklung unterbrochen, bevor sich die Kutikula der Adulttiere im Puparium pigmentiert hat. Die Tiere gehen in Diapause über. Die photoperiodisch empfindliche Periode der Entwicklung betrifft die (intrauterinen) Embryonen (nach der Vitellogenese) und die drei Larvenstadien, vor allem aber das zweite und dritte. Eine bestimmte Zahl von Kurztagen ist nötig, damit es zur Diapause kommt (photoperiodischer Zähler). Die Lichtrezeptoren befinden sich im Gehirn. Im Kurztag kommt es zu Hormonmangel und damit zur Diapause (SAUN-DERS AND DENLINGER (1971), DENLINGER (1972)). Im Langtag wird die Metamorphose nicht durch Diapause unterbrochen. Die adulten Tier schlüpfen, die Weibchen paaren sich und eine neue Generation kann entstehen.

Ob die Tiere sich in Diapause befinden, lässt sich leicht feststellen: Öffnet man das Puparium xx Tage nach yy, sind Tiere in Diapause hell, pigmentierte Tiere haben keine Diapause (Saunders (1973a)). Ein Praktikumsversuch dazu ist in Engelmann (1999) beschrieben.

Sarcophaga ist ein gutes Beispiel für das Modell der externen Koinzidenz ((Saunders (1992), siehe Seite 282).

## 13.3.5 Drosophila

Mehrere Fälle von Diapause wurden bei Drosophila-Arten beschrieben. Diapause kann je





Die Fleischfliege Sarcophaga argyrostoma durchläuft drei Larvenstadien, verpuppt sich und die Metamorphose findet statt. Im Kurztag wird die Entwicklung der Fliege vor der Pigmentierung der Kutikula angehalten und eine Diapause beginnt. Dieses Stadium erkennt man an der unpigmentierten hellen Kutikula des Tieres. Im Langtag (kritische Tageslänge 14.5 bis 15 Stunden) findet keine Diapause statt. Das ist an den pigmentierten Fliegen im Puparium zu erkennen. Nach SAUNDERS AND DENLINGER (1971) und Denlinger (1972). E218z/sarcophaga-pp

nach Art im Adultstadium (Drosophila robusta, Drosophila obscura, Drosophila phalerata, Drosophila littoralis, Drosophila transversa und Drosophila subobscura), im Puppenstadium (Drosophila alpina) oder im Larvenstadium (Drosophila deflexa) stattfinden. Drosophila deflexa bleibt im Winter im Larvenstadium und verpuppt sich erst im Frühjahr (Basden (1954)). Eine Diapause im Adultstadium wurde während des Winters für Drosophila nitens (Burla (1951)), Drosophila robusta (Carson and Stalker (1948)), Drosophila subobscura (Basden (1954)) beschrieben. In Japan wurden zahlreiche Arten von Toda (Toda (1979), Beppu et al. (1996)) und auch verschiedene aurelia-Arten auf ihre photoperiodische Reaktion hin untersucht. Die geographischen Rassen von den verschiedenen japanischen Inseln unterscheiden sich durch ihre Temperaturabhängigkeit (Pittendrigh and Takamura (1987)). Wahrscheinlich ist Diapause bei Drosophila-Arten in gemäßigten und vor allem in höheren Breiten weiter verbreitet als bisher bekannt.

Als Beispiel für Diapause bei Drosophila wird Drosophila littoralis vorgestellt. Die Weibchen sind photoperiodisch empfindlich. Bei Kurztag werden keine Eier gebildet. Die Gonaden bleiben klein. Es handelt sich also um eine Diapause im Adultstadium. Im Langtag wird die Diapause beendet (5 bis 10 Tage nötig). Die Art kommt in Europa in verschiedenen geographischen Rassen von Nordfinnland bis Italien vor. Je nach der geographischen Breite unterscheidet sich die kritische Tageslänge (Abbildung 13.34). Sie beträgt bei Tieren von Oulu (Stamm 1036, 65.0<sup>0</sup>N) 20 Stunden, 18.8 Stunden bei Tieren von Inari  $(68.8^{\circ}N)$ , 18 Stunden bei Tieren von Paltamo  $(65.0^{0}N)$ , 12.3 Stunden bei Tieren von Batumi (Stamm 1052, 41.6<sup>0</sup>N). Tiere vom Tessin (Stamm 1008,  $46.2^{\circ}$ N) haben keine Diapause (Lankinen and Lumme (1984)).

Eine Diapause wird bei weiblichen Drosophila melanogaster durch Kurztag im Ovarstadium

induziert. Wie in den meisten Fällen wird auch hier die Nachtlänge und nicht die Tageslänge gemessen und dafür ein circadianes System benutzt. Saunders et al. (1989) zeigten, daß auch bei arrhythmischen Mutanten mit fehlender DNA des per Locus Diapause induziert wird (siehe Abbildung 13.35). Das zeigt erstens, daß bei der photoperiodischen Induktion und der lokomotorischen Aktivität sowohl auf molekularer als auch neuronaler Ebene verschiedene circadiane Mechanismen beteiligt sind. Zweitens wird damit klar, daß das per Gen nicht kausal beim Messen der Nachtlänge durch die photoperiodische Uhr beteiligt ist. Das per Gen beeinflusst aber die photoperiodische Zeitmessung, da bei Fliegen mit defektem  $(per^{01})$  oder fehlendem  $(per^{-})$  per Locus die kritische Dunkelperiode geändert ist. Bei diesen arrhythmischen Mutanten ist die kritische Lichtperiode bei  $per^{01}$  um 3 Stunden und bei  $per^{-}$  um 5 Stunden kürzer. Es gab aber keine Unterschiede in der kritischen Tageslänge zwischen Wildtyp einerseits und den kurz-periodischen  $(per^s)$ und lang-periodischen Mutanten  $(per^{L2})$  and ererseits.



Abbildung 13.35: Die kritische Tageslänge der arrhythmischen Mutante per $^{\circ}$  von *Dro*sophila littoralis ist kürzer als die des Wildtyps. Nach Lankinen and Lumme (1984). E215An/diapause-rassen



Abbildung 13.34: Kritische Tageslänge bei *Drosophila*] Die kritische Tageslänge nimmt bei verschiedenen geographischen Rassen von *Drosophila littoralis* (Herkunft siehe Markierungen in der Karte von Europa) mit höherem Breitengrad zu (40 bis  $70^{0}$ N, untere Kurve). Nach Lankinen and Lumme (1984). D215N/diapause-rassen und E211A

Für die Synchronisation der circadianen Uhr und für die photoperiodische Zeitmessung sind die Komplexaugen und Ozellen nicht essentiell. Die verantwortlichen extraretinalen Rezeptoren und die circadiane Uhr befinden sich nicht in den optischen Lappen, sondern vielmehr im Zentralgehirn. Laterale neurosekretorische Zellen dienen als Schrittmacher und als Photorezeptoren. Die zellulären Grundlagen des photoperiodischen Mechanismus haben möglicherweise mit der pars intercerebralis des Mittelhirns zu tun.

Die Genetik der Diapause verschiedener Stämme von *Drosophila littoralis* wurde von einer Gruppe in Oulu (Finnland) untersucht (Lankinen and Lumme (1984)). Der Faktor für Diapause segregiert wie eine einzelne Mendelsche Einheit (x-Chromosom, in der Nähe des white-Locus). Er ist variabel genug, um die unterschiedlichen kritischen Tageslängen der verschiedenen geographischen Rassen zu erklären (12 bis 18 Stunden). Diapause ist dominant über nicht-Diapause (Lumme and Lakovaara (1979)). Bei der Tageslängenmessung sind neuronale und hormonelle Ereignisse beteiligt, wie an *Drosophila grisea* gezeigt wurde (Kambysellis and Heed (n.d.)).

# 13.3.6 Diapause beim Seidenspinner

Als letztes Beispiel für Diapause wird der chinesische Seidenspinner *Bombyx mori* vorgestellt. Er gehört zur Insektenordnung der *Lepidopteren* und dort zur Familie der echten Spinner (*Bombycidae*). Er kommt in den tropischen und subtropischen Regionen vor allem in Asien vor.

Der Lebenszyklus der Tiere und die photoperiodische Steuerung sind in Abbildung 13.36 dargestellt. *Bombyx mori* weist eine Diapause im Eistadium auf. Diese Seidenspinner sind Langtag-Tiere, im Gegensatz zu vielen anderen Insekten mit Diapause. Die Weibchen legen im Frühjahr, also unter Kurztagen, Eier ab. Sie entwickeln sich ohne Diapause. Weibchen im Langtag legen hingegen Diapause-Eier ab (Meenal et al. (1994)). Diapause beginnt in einem bestimmten embryonalen Stadium und hält so lange an, bis die Umgebungstemperatur für mindestens 14 Tage auf 5<sup>0</sup>C abgesunken ist. Die niedrige Temperatur beendet die Diapause. Während der Diapause findet keine Zellteilung statt (sie wird in der G-2 Phase gestoppt) und die Entwicklung des Embryos wird unterbrochen.

Unterschiede zwischen Kurztag- und Langtag-Tieren wurden gesucht und gefunden: Lang $tag^3$  induziert bei *Bombyx mori*-Weibchen in den neurosekretorischen Zellen des Gehirns ein Signal. Es gelangt auf neuronalem Weg zum Unterschlundganglion. Dort wird ein Diapause-Hormon produziert und ausgeschüttet (Abbildung 13.37). Über die Hämolymphe gelangt es zu den Ovarien und verhindert, dass sich die Embryonen entwickeln. Stattdessen gehen diese in Diapause (Nakagaki et al. (1991)). Das Diapause-Hormon ist ein Neuropeptid aus 24 Aminosäuren. Es wurde kloniert (Xu et al. (1995a), charakterisiert (Yamashita (1996)) und synthetisiert (Ikeda et al. (1993), Saito et al. (1994)).

Das Diapause-Hormon-Gen wird im Subösophagalganglion von Puppen und pharaten Adulttieren exprimiert, aber nicht in anderen Geweben. Es konnte in 12 neurosekretorischen Zellen in der Nähe der ventralen Mittellinie des Subösophagalganglions lokalisiert werden. Diese Zellen sind in drei Gruppen angeordnet (Sato et al. (1994)). Sie produzieren das Diapause-Hormon und projizieren zum

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Die Kopfkapsel von *Bombyx mori* besitzt im Puppenstadium ein durchsichtiges Dreieck. Dadurch kann Licht leichter zu den Photorezeptoren im Gehirn gelangen (Bounhiol and Moulinier (1965))



Abbildung 13.36: Die Weibchen des Seidenspinners legen im Kurztag Eier ab, die sich ohne Diapause entwickeln (innerer Kreis). Aus den Eiern schlüpfen Larven, die sich vier mal häuten. Nach der letzten Häutung verpuppen sich die Tiere in einem aus Seide gesponnenen Kokon. Im Langtag entwickeln sich Weibchen, die Diapause-Eier produzieren (äußerer Kreis). Sie überdauern den Winter. Diapause tritt in einem bestimmten Embryonalstadium auf. Zur Weiterentwicklung müssen die Embryonen für zwölf bis vierzehn Tage auf mindestens 5<sup>0</sup> C abgekühlt werden. Das setzt einen Prozess in Gang ('Weckeruhr'), der bei höherer Temperatur die Diapause beendet und die Entwicklung reaktiviert. Nach Isobe and Goto (1980). E225/bombyx-zyklus



Abbildung 13.37: Geschlüpfte und noch in Puppen befindliche Weibchen von *Bombyx mori* werden im Langtag über neurosekretorische Zellen im Gehirn dazu induziert, Diapause-Eier abzulegen. Von den neurosekretorischen Zellen gelangt ein Signal über Nervenbahnen zum Unterschlundganglion. Im lateralen Teil des Unterschlundganglions (Anordnung siehe rechter Teil der Abbildung, nach Sato et al. (1994)) befinden sich Diapause-Hormon-produzierende Zellen. Von hier gelangt das Diapause-Hormon (ein Neuropeptid aus 24 Aminosäuren, Xu et al. (1995b), Sato et al. (1994)) über die Hämolymphe zum Ovar. Es stimuliert die Trehalase (die für die Glykogensynthese zuständig ist), hemmt die Esterase A4 (die Dotterproteine für die Embryonalentwicklung aktiviert) und erhöht die Permeabilität für 3 Hydroxi-Kynurenin (welches die Bildung von Ommochromen und damit die Pigmentierung der Diapause-Eier bewirkt). Letztlich wird durch das Diapause-Hormon die Embryonalentwicklung im Diapause-Ei unterbunden (Isobe and Goto (1980)). 226/diapause-hormon

Corpus cardiacum (Ichikawa et al. (1995)). Diapause-Hormon, auch das synthetische, induziert die Expression des Trehalase-Gens in den sich entwickelnden Ovarien. Die TrehalasemRNA stieg 4 Stunden nach der Injektion um das 6fache an (Ikeda et al. (1993), Su et al. (1994)).

Die Reaktionen während der Kühlperiode  $(5^{0}C, Überwinterung)$  und danach sind durch die Arbeiten von Kai und Mitarbeitern biochemisch gut bekannt (Kai et al. (1995b)). Die Länge der Kühlperiode wird durch eine Esterase EA4 (Time-interval-measuring-esterase, eine ATPase) gemessen. Nach 14 Tagen niedriger Temperatur wird die EA4 sowohl in vivo als auch in vitro aktiviert. Dadurch läuft die Embryogenese wieder weiter (Kai et al. (1995a)). EA4 stellt also eine Art molekularen Zeitmesser dar (Abbildung 13.38).

Die Diapause der Embryonen in den Eiern wird durch eine Kälteperiode ( $5^{0}C$ , Überwinterung) beendet. Die Zellen gehen dann rasch in die S-Phase über. Dabei misst ein Enzym die Dauer der Kühlung. Nach einer zweiwöchigen Kälteperiode wird die Embryonalentwicklung wieder in Gang gesetzt. Parallel dazu wird auch eine Esterase (EA4=TIME, Time-Interval-Measuring-Esterase) aktiviert, und zwar in vivo und in vitro (Kai et al. (1995b)). EA4 besitzt eine Art Zeitmess-Aktivität, ist also ein molekularer Zeitmesser (Abbildung 13.38). Welcher Mechanismus aktiviert diese Zeitmessung? Eine bestimmte Komponente ist dazu nötig, PIN ('peptidyl-inhibitory needle'). Es ist ein Peptid mit bekannter Aminosäure-Sequenz (Isobe et al. (1995)) und stellt einen Faktor dar, der die Zeit festhält (Kai et al. (1999)). Es bildet mit EA4 einen äquimolaren Komplex, durch den EA4 inaktiv wird. Bei niedriger Temperatur dissoziiert PIN von EA4. Das dauert bei  $5^{0}$ C 14 Tage<sup>4</sup> und besteht aus einer Folge von Konformationsänderungen von EA4, deren Me-

<sup>4</sup>wenn die Eier 2 Tage nach Eiablage in die niedrige

chanismus in der Proteinstruktur eingebaut ist. Beim Übergang zu  $25^{0}$ C wird EA4 plötzlich für kurze Zeit aktiv (Kai et al. (1991)). Danach nimmt die EA4-Aktivität wieder ab. Als Ergebnis treten die Embryozellen rasch in die S-Phase ein.

Statt durch niedrige Temperatur kann PIN auch über ein Sephadex Gelfilter entfernt werden. Die EA4 Aktivität ist dann bereits nach 7 Stunden in  $25^{0}$ C nachweisbar (Kai et al. (1999)). In Gegenwart von PIN ist EA4 hitzestabil. Hohe Temperatur stört die Zeitmessung nicht (Kai et al. (1995b)).

Wir haben es hier also mit einem Zeitmessvorgang zu tun, der lange Zeiträume mit einem Sanduhrprinzip misst. Er legt nach einer bestimmten Zeit vom Ende der Diapause an einen Schalter in der Entwicklung um. Es ist noch unbekannt, wie EA4 die Embryogenese wieder in Gang setzen kann. EA4 ist ein Glycoprotein, dass am N-Ende mit einem Oligosaccharid verknüpft ist. Das Kohlenhydrat scheint für die Regulation der EA4 Zeitmessung durch Interaktion mit PIN entscheidend zu sein (Tani et al. (2001)). Andere Zeitmesser für Entwicklungsvorgänge sind bekannt (zum Beispiel Hensey and Gautier (1997)).

### 13.3.7 Charakteristika der Diapause

Nach diesen Beispielen für Diapause sind einige allgemeine Bemerkungen angebracht. Diapause ist eine Strategie vieler Insekten und Milben, ungünstige Jahreszeiten zu überdauern (Danks (1987)). Sie ist ein Zustand der Dormanz, in dem die Entwicklung gestoppt oder drastisch reduziert ist, der Stoffwechsel niedrig ist, keine Reproduktion stattfindet, das Verhalten geändert ist und die Tiere gegen Kälte, Hitze oder Trockenheit resistent werden. Im Gegensatz zur Quieszenz beginnt die Diapause schon,

Temperatur gebracht werden. Werden sie erst 10 Tage nach Eiablage gekühlt, dauert es 50 Tage



Abbildung 13.38: Im Kurztag werden von *Bombyx mori*-Weibchen Eier abgelegt, deren Embryonen eine hohe Aktivität der Esterase A4 haben. Sie entwickeln sich bei  $25^{0}$ C über die Larvenstadien zum Adulttier. Im Langtag ist die Esterase A4 nicht aktiv. Es wird eine Kälteperiode von mindestens  $5^{0}$ C benötigt (schwarzer Balken unter der x-Achse), damit die Esterase A4 aktiv wird. Sie bricht die Diapause und die Embryonen können sich bei höherer Temperatur (heller Balken unter der x-Achse) weiterentwickeln. Bei  $25^{0}$ C (heller Balken) schlüpfen die Larven 14 Tage nach Ende der niedrigen Temperatur-Periode. Dabei misst die Esterase A4 (EA4=TIME, Time-Interval-Measuring-Esterase) die Dauer der Kühlung, indem sie intramolekular modifiziert und dadurch aktiviert wird. Das geschieht in vivo und in vitro. EA4 ist also ein molekularer Zeitmesser und Wecker. Nach Kai et al. (1995b). D228/esterase-bombyx

bevor die Umweltbedingungen ungünstig werden. Sie endet erst, nachdem die *Diapauseentwicklung* beendet ist, auch wenn die Umweltbedingungen inzwischen wieder günstig sind.

Die Diapause wird meistens photoperiodisch induziert (Temperatur, Futter, Feuchtigkeit können in manchen Fällen ebenfalls eine Rolle spielen). Photorezeptoren (siehe Unterabschnitt 13.3.12) empfangen die photoperiodischen Signale und unterscheiden Licht von Dunkelheit. Die Länge der Nacht (die Tageslänge wird selten verwendet) wird durch ein System bestimmt, das dafür eine circadiane Uhr benutzt. Ein photoperiodischer Zähler summiert die photoperiodisch wirkenden Zyklen auf. Nach einer Mindestanzahl werden die Informationen an ein Zentrum geleitet, das die integrierte Information verarbeitet und die photoperiodischen Ereignisse an den Zielorganen kontrolliert (Abbildung 13.39). Nur in wenigen Fällen wird die Diapause auch photoperiodisch beendet. Normalerweise sind andere Bedingungen wie zum Beispiel eine bestimmte Zeit niedriger Temperaturen oder interne Vorgänge nötig, um die Diapause zu beenden.

# 13.3.8 Verschiedene Typen der Diapause

In vielen Gebieten der gemäßigten und höheren geographischen Breiten sind die Winter für die Entwicklung von Organismen allgemein und für Insekten im besonderen besonders ungünstig. Deshalb findet man hier Winterdiapause. In anderen Gebieten der Erde ist dagegen Trockenheit der begrenzende Faktor. Das gilt beispielsweise für Wüstengebiete. Hier findet man häufig Sommerdiapause. Die photoperiodischen Bedingungen, die zur Winterdiapause führen, sind Kurztage, die zur Sommerdiapause führen, Langtage (Saunders (1982)).

Bei Insekten, deren postembryonale Entwicklung ein Jahr oder mehrere Jahre dauert (uni-



Abbildung 13.39: Ein Photorezeptor perzipiert photoperiodisch wirkendes Licht. Signale gelangen zu einem Zeitmeß-System, einer circadianen Uhr. Ein photoperiodischer Zähler summiert diese Signale. Wird ein Schwellenwert erreicht, findet in einem Zentrum die photoperiodische Induktion statt: Ein endokriner Schalter steuert die photoperiodische Kontrolle der Vorgänge an den Zielorganen. Sie führen je nach Photoperiode und Reaktionstyp zur Entwicklung oder zur Diapause (Entwicklungsstop) des Tieres. Nach L and L (1990). E198/diapause-schema



Abbildung 13.40: Obligate Diapause gibt es bei univoltinen Arten in einem bestimmten Entwicklungsstadium. Bei multivoltinen Arten mit mehreren Generationen pro Jahr ist die Diapause fakultativ: Sie tritt nur in der Generation ein, in der die äußeren Bedingungen die Diapause induzieren (zum Beispiel Kurztag im Herbst). Nach Lumme (1978). E199/diapause-typen

voltine Arten), erfolgt die Diapause bei jedem Tier in einem bestimmten Entwicklungsstadium. Man nennt diese Diapause obligat. Bei multivoltinen Arten mit mehreren Generationen pro Jahr ist die Diapause fakultativ: Sie tritt nur in der Generation ein, in der die äußeren Bedingungen die Diapause induzieren (zum Beispiel Kurztag im Herbst, Abbildung 13.40). Bei einigen Insekten wie zum Beispiel *Bombyx mori* gibt es Stämme mit obligatorischer Diapause und andere mit fakultativer Diapause (Isobe and Goto (1980)).

# 13.3.9 Diapausestadien

Die Diapause kann im Puppenstadium, Adultstadium, Eistadium oder einem der Larvenstadien stattfinden. In welchem Stadium sie stattfindet, ist charakteristisch für die verschiedenen Arten. Wir haben bereits verschiedene Möglichkeiten kennen gelernt (Seite 266 bis Seite 270).

Die Larvendiapause findet meistens im letzten Larvenstadium statt. Aber auch hier gibt es Ausnahmen: Bei *Choristoneura funiferana* ist es das zweite Larvenstadium, in dem die Diapause auftritt (Harvey (1961)), bei *Dendrolimus piri* kann die Diapause je nach den Bedingungen in verschiedenen Larvenstadien beobachtet werden (Geispitz (1965)).

Meistens ist das photoperiodisch empfindliche Stadium vor dem Stadium, in dem die Diapause stattfindet. Beispielsweise können junge Larvenstadien photoperiodisch induziert werden, während die Diapause erst im letzten Larvenstadium auftritt. Beim Seidenspinner Bombyx mori sind Ei und erstes Larvenstadium photoperiodisch empfindlich. Die Reaktion auf dieses Signal erfolgt im Muttertier: Es produziert ein Diapausehormon. Es verhindert die Weiterentwicklung des Embryos im Ei (siehe Unterabschnitt 13.3.6). Beim Riesenseidenspinner *Philosamia cynthia* sind die Larven im 4. und 5. Stadium auf Kurztag empfindlich. Bei *Diataraxia oleracea* ist das letzte Larvenstadium für nur zwei Tage photoperiodisch empfindlich. Näheres in Saunders (1982).

### 13.3.10 Geographische Rassen

Da der Beginn der ungünstigen Bedingungen in den verschiedenen Gebieten unterschiedlich liegt, finden wir auch Unterschiede in der kritischen Tageslänge bei Stämmen verschiedener geographischer Breiten. Solche Ökotypen finden wir beispielsweise beim Bärenspinner Acronycta rumicis (Abbildung 13.41). Hier sind die Unterschiede in der kritischen Photoperiode allmählich. Beim Kohlweisling *Pieris brassicae* dagegen gibt es nur zwei geographische Rassen (Abbildung 13.41). Die Genetik solcher Rassen ist besonders gut an Drosophila-Arten untersucht (Lankinen and Lumme (1984)).

# 13.3.11 Induktion und Termination der Diapause

Bei einer Reihe von Insekten wird die Diapause im gleichen Stadium photoperiodisch induziert und beendet. Dazu gehören beispielsweise der Riesenseidenspinner Antheraea pernyi, der Maiszüngler Ostrinia nubilalis, die Kannenpflanzen-Zuckmücke Metriocnemus knabi. Die Kurztage des Herbstes induzieren beim Maiszünsler die Diapause im Puppenstadium, die länger werdenden Tage im Frühjahr brechen sie (Abbildung 13.42). Photoperiodisch empfindlich sind die letzten Larvenstadien und das Puppenstadium. Bei anderen Insekten wird die Diapause schon in Stadien induziert, die weit vor dem eigentlichen Ruhestadium liegen. Dann wird die Diapause häufig durch andere Faktoren als durch die Tageslän-



Abbildung 13.41: Geographische Rassen von Acronycta rumicis (oben) und Pieris brassicae (unten) von verschiedenen geographischen Breiten. Prozent Diapause als Funktion der Tageslänge. Nach Danilevskii (1965). Acronyctageorassen D200n

ge gebrochen, zum Beispiel durch eine längere Periode niedriger Temperatur.



Abbildung 13.42: Die Kurztage des Herbstes induzieren die Diapause des Riesenseidenspinners Antheraea pernyi, die länger werdenden Tage im Frühjahr brechen sie. Die jeweiligen kritischen Tageslängen sind gleich. Photoperiodisch empfindlich sind die letzten Larvenstadien und das Puppenstadium. Nach Saunders (1982), Williams and Adkisson (1964). D202n/Antheraea-ppinduktion

Bei Antheraea pernyi wird die Diapause photoperiodisch induziert und gebrochen. Die kritischen Tageslängen sind für beide Vorgänge gleich (Abbildung 13.42). Das deutet darauf hin, das an beiden Reaktionen das gleiche Zeitmeß-System beteiligt ist. Die Wellenlängen 400 bis 500 (blau und grün) sind photoperiodisch am wirkungsvollsten. Der Photorezeptor liegt im Gehirn. Über dem Gehirn ist ein durchsichtiges Fenster in der Kutikula der Puppe. Dadurch kann Licht leichter eindringen. Allerdings spielt das wohl normalerweise keine große Rolle, sondern nur bei schattiger Lage des Kokons. Wichtiger ist der Kokon, der eine ideale Lichtsammelkugel darstellt. Die kritische Tageslänge gibt an, bei welcher Länge der Lichtperiode eine Population zu 50% photoperiodisch induziert würde. Im Fall der Diapause-Induktion des Maiszünslers sind das 14.2 Stunden (13.42). Bei längeren Lichtperioden würden weniger oder keine, bei kürzeren mehr oder alle in den Diapausezustand übergehen. Bei der Beendigung der Diapause ist die kritische Tageslänge beim Maiszünsler ebenfalls 14.2 Stunden.

### 13.3.12 Photorezeptoren

Um die Tageslänge zu messen, sind Lichtrezeptoren nötig. Ihre photoperiodische Empfindlichkeit beginnt meistens während der Dämmerung zwischen Werten von 10 bis 100 Lux. In diesem Bereich sind die Änderungen der Lichtintensität im Freien am stärksten (Abbildung 13.43). Die Photorezeptoren können jedoch unterschiedlich stark vom Außenlicht abgeschirmt sein. Dann spielen die optischen Eigenschaften zum Beispiel des Kokons, der Kutikula, des Überwinterungsverstecks eine Rolle.

Kandidaten für solche photoperiodischen Photorezeptoren sind die Komplexaugen, Ozellen und Licht-empfindliche Strukturen des Gehirns. Sie sind bei den verschiedenen Insekten mit Diapause unterschiedlich (Abbildung 13.44). Die Wirksamkeit verschiedener Wellenlängen wurde in einigen Fällen bestimmt (Numata et al. (1997)).

## 13.3.13 Zeitmeßsystem

Nachdem der photoperiodische Reiz wahrgenommen wurde, muss ein Zeitmeßsystem die Tageslänge bestimmen und je nach dem Ergebnis (Tageslänge unterhalb oder oberhalb eines kritischen Wertes) verschiedene Folgeprozesse einleiten. Dazu gibt es einige Modellvorstellungen, aber nur wenige konkrete Vorstellungen.



Abbildung 13.43: Wie sich die Lichtintensität während eines Tages verändert, ist für den 2.4.1966 in Tübingen (48<sup>0</sup>32'N, 9<sup>0</sup>3.5'O) gemessen worden. Klares Wetter, Neumond. In der Dämmerung sind die Änderungen der Lichtintensität bei Werten zwischen 10 und 100 Lux maximal. Nach Erkert (1969). D203n/lint-aenderung

Mit Lichtpulsen, die zu verschiedenen Zeiten der Dunkelperiode gegeben werden, konnte gezeigt werden, dass es eine oder in anderen Fällen auch zwei empfindliche Zeiten für photoperiodisch wirkendes Licht gibt. In Abbildung 13.45 finden von 0 Uhr Uhr (circadiane Zeit) ab die Vorgänge a, später b, c, d, e und f statt. Trifft Licht auf den Vorgang c, wird die photoperiodische Entscheidung *Entwicklung* getroffen. Später (zum Beispiel in e und f) werden dann Faktoren gebildet, die die Weiterentwicklung bewirken. Wenn kein Licht c trifft, wird die Entscheidung *Diapause* getroffen.

### 13.3.14 Photoperiodischer Zähler

In manchen Fällen genügt zur Induktion der Diapause ein einziger induktiver Zyklus wie beispielsweise bei *Chaoborus americanus* (Bradshaw (1969)). Meistens sind jedoch mehrere induktive Zyklen nötig.



Abbildung 13.44: Photoperiodische Rezeptoren wurden in den rot markierten Gebieten der sechs Arthropoden lokalisiert (Frontalansicht des Gehirns, der optischen Lappen und der Augen). Nach Numata et al. (1997). 204/pp-receptoren-insekten



Abbildung 13.45: Vom circadianen Zeitpunkt 0 Uhr Uhr ab finden die Vorgänge A, später B, C, D, E und F statt. Trifft Licht auf den Vorgang C, wird die photoperiodische Entscheidung *Entwicklung* getroffen. Später (zum Beispiel in E und F) werden dann Faktoren gebildet, die die Weiterentwicklung bewirken. Wenn kein Licht C trifft, wird die Entscheidung *Diapause* getroffen. Nach Cymborowski (1992). 205/pplicht-nachts

Die Zahl der nötigen Zyklen ist unabhängig von der Umgebungstemperatur ( $Q_{10}$  von 1.04), während Lebensdauer, Larvenentwicklung und Ovipositionsrate eine normale Temperaturabhängigkeit mit einem  $Q_{10}$  von 2.7 zeigen. Bei Mamestra brassicae werden die Kurztage, bei der Blattlaus Megoura viciae die Langtage, beim Bärenspinner Acronycta rumicis beide gezählt (siehe das Kapitel über den photoperiodischen Zähler in Saunders (1982)).

Die Schlupfwespe Nasonia vitripennis ist für Untersuchungen zum photoperiodischen Zähler besonders geeignet: Die Mutter ist photoperiodisch empfindlich und überträgt die photoperiodischen Effekte über die Eier auf die Larven. Die Eier werden täglich abgelegt, sodass der physiologische Zustand des Muttertieres an den Nachkommen (diapausierend oder nicht) verfolgt werden kann (Abbildung 13.46).



pp-zaehler-beispiel | D206 | 18.4.2002

Abbildung 13.46: Photoperiodischer Zähler bei der Schlupfwespe Nasonia vitripennis. Das Muttertier ist photoperiodisch empfindlich und überträgt die photoperiodischen Effekte über die Eier auf die Larven. Die Eier werden täglich abgelegt, sodass der physiologische Zustand des Muttertieres verfolgt werden kann. Nach Saunders (1966). D206/pp-zaehler-beispiel

#### 13.3.15 Modelle

Zur photoperiodischen Zeitmessung wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen(diskutiert in Saunders (1982), Vaz Nunez and Saunders (1999) und Tauber and Kyriacou (2001) und unter Spezialthemen Abschnitt 20). Sie beruhen entweder auf einem Sanduhr-Prinzip<sup>5</sup> (Lees (1973)) oder auf einem circadianen Oszillator ('externe Koinzidenz', Bünning (1936)) oder auf zwei miteinander interagierenden Oszillatoren ('interne Koinzidenz'). Ein neueres Modell von Lewis and Saunders (1987) berücksichtigt auch die Zahl der Zyklen, die nötig sind, um die Diapause zu induzieren. Damit können auch die verschiedenen Formen photoperiodischer Responsekurven und die Ergebnisse komplizierterer Lichtprogramme wie in Nanda-Hamner- und Bünsow-Experimenten simuliert werden. Auch die Doppelrolle des Lichtes, nämlich das photoperiodische Zeitmeßsystem zu synchronisieren und die photoperiodische Reaktion zu beeinflussen, wird mit diesem Modell berücksichtigt. Andere Modelle wie das der internen Koinzidenz können beispielsweise die niedrige photoperiodische Reaktion bei sehr kurzen Lichtperioden und im Dauerdunkel nicht erklären. Nach dem hier vorgestellten Modell wären diese Effekte das Ergebnis eines gedämpften circadianen Oszillators: Es wird ein Faktor aufsummiert, bis in einer bestimmten Zahl von Tagen (required day number RDN) eine Schwelle erreicht worden ist, die Induktion ermöglicht (Abbildung 13.47). Dabei kann es sich sowohl um einen Stoff handeln, der durch die photoperiodische Behandlung die Reaktion aktiv fördert, als auch um einen Stoff, der durch die photoperiodische Behandlung die Reaktion hemmt. Beides wurde gefunden und in beiden Fällen sind neurosekretorische Zellen beteiligt. Ein endokriner Effektor setzt dann dieses Signal in die Diapausereaktion um.

# 13.3.16 Physiologische Grundlagen, Endokrinologie der Diapause

Die Diapause ist durch bestimmte Anpassungen und Umstellungen des Stoffwechsels charakterisiert. So werden Substanzen wie Glycerol und Sorbitol in die Hämolymphe abgegeben, die als Gefrierschutzmittel dienen. Reservestoffe wie Fette, Proteine und Kohlenhydrate werden gebildet. Durch Wachs wird die Kutikula unempfindlich gegen Austrocknung. Wie werden diese Anpassungen und Umstellungen induziert?

Photorezeptoren, Mess-System und photoperiodischer Zähler der photoperiodischen Induktion der Diapause bei Insekten befinden sich im Gehirn.

Bei vielen Insektenarten mit Diapause im Larven-, Puppen- und Nymphenstadium wird die Diapause durch Hormonmangel erzeugt (Abbildung 13.48). Dadurch wird das Gehirn-Prothorakaldrüsen- System inaktiviert. Die Tageslänge wird von neurosekretorischen Zellen im Gehirn wahrgenommen. Bei Diapauseinduzierender Tageslänge (zum Beispiel Kurztag) wird vom Gehirn kein Gehirnhormon BH (=PTTH, Prothoracotropes Hormon)<sup>6</sup> gebildet, die Prothorakaldrüse bildet kein Ecdyson, die Entwicklung wird gestoppt. Das äußert sich bei dem Riesenseidenspinner Hyalophora cecropia, bei Ostrinia nubilalis, bei Pieris rapae und bei Sarcophaga unter anderem in einem niedrigen Stoffwechsel, niedrigem Wassergehalt, hohem Fettgehalt, geändertem Verhalten (beispielsweise Spinnen eines Kokons). Als Folge davon wird die Entwicklung unterbrochen.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Die Tageslänge wird wie mit einer alten Eieruhr gemessen, in der feiner Sand aus einer Glasblase durch eine dünne Verbindung in eine andere Glasblase rinnt.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>Das Brainhormon BH ist ein großes, nicht dialysierbares hitzestabiles Molekül. Sein Molekulargewicht ist größer als 10000.



Abbildung 13.47: Modell des photoperiodischen Zählers von Lewis und Saunders. Oben links: Kontrollsystem eines Rückkopplungsoszillators. Synthese der oszillierenden Substanz  $c_t$  wird durch die Differenz zwischen Referenzwert  $c_{ref}$  und dem Zeit-verzögerten Wert von  $c_t$  ( $c(t - t_0)$ ) bestimmt. Licht erhöht die Konzentration von  $c_t$ , während ständig ein Teil der Substanz verloren geht. Oben rechts: Je nach Syntheserate SR ergeben Simulationen die blauen Kurven. Niedrigere Raten ergeben stärkere Dämpfung. Horizontale Linien sind Schwellenwerte, und  $c_t$ Werte über diesen Schwellenwerten werden über die Zeit summiert (INDSUM Bildung, unten rechts). Dynamik der Syntheserate im unteren linken Diagramm als Funktion der ( $c(t-t_0)$ ) Werte. Syntheserate ist durch eine obere Grenze beschränkt, um zu vermeiden, dass die Amplitude der Schwingungen zu groß wird (unten linkes). Nach Lewis and Saunders (1987), Saunders and Lewis (1987b), Saunders and Lewis (1987a). D207n/pp-zaehler



Abbildung 13.48: Bei Diapause im Larven-, Puppen- und Nymphenstadium (zum Beispiel bei *Hyalophora cecropia*, Ostrinia nubilalis, Pieris rapae, und Sarcophaga) wird der Entwicklungsstop durch Hormonmangel erzeugt: Das Gehirn- Prothorakaldrüsen- System wird inaktiviert. Die Tageslänge wird von neurosekretorischen Zellen im Gehirn wahrgenommen. Bei Diapause-induzierender Tageslänge (zum Beispiel Kurztag) wird vom Gehirn kein Gehirnhormon gebildet, die Prothorakaldrüse bildet kein Ecdyson. Die Entwicklung wird gestoppt. Nach Williams (1952). E208/diapausehormonmangel

In anderen Fällen, bei denen die Larven Diapause zeigen, bleibt dagegen das endokrine System *aktiv* (Abbildung 13.49). Die Larven können sich häuten, es kommt aber zu keiner Verpuppung. Sie wird durch Juvenilhormon verhindert. Das Gehirn bewirkt weiterhin, dass in den Corpora allata Juvenilhormon gebildet und ausgeschüttet wird. Damit sich die Larven häuten können, muss aber auch die Prothorakaldrüse funktionieren und Ecdyson ausschütten. Ein Beispiel dafür ist der Zünsler *Diatraea* grandiosella.

In der Larven-Diapause ist der Stoffwechsel gering, der Körper enthält wenig Wasser, Fettreserven sind angelegt, die Metamorphose ist gehemmt, die lokomotorische Aktivität reduziert. Zum Teil finden fortlaufende Larvenhäutungen statt. Die Entwicklung wird durch Temperatur oder Photoperiode reaktiviert.

Bei der Diapause im Imaginalstadium werden neurosekretorische Zellen inaktiviert, die die Corpora allata kontrollieren. Die inaktiven Corpora allata produzieren kein Juvenilhormon und damit werden die Ovarien gehemmt. Das ist beispielsweise beim Kartoffelkäfer der Fall (Unterabschnitt 13.3.3). Parallel dazu ändert sich das Verhalten. Die Adulttiere werden negativ phototaktisch, hören auf zu fressen und kriechen in den Boden. Werden beim Kartoffelkäfer die Corpora allata entfernt, wird Diapause induziert. Werden Corpora allata in diapausierende Tiere implantiert, entwickeln sie sich. Kurztag hemmt also die Produktion und Abgabe von Juvenilhormon, die Reproduktion unterbleibt und die Diapause beginnt. Die Ecdyson-Produktion ist normal.

Bei der *Ei-Diapause* vom Seidenspinner *Bombyx mori* wird das photoperiodische Signal *Langtag* vom Muttertier wahrgenommen und ein Diapausehormon des Unterschlundganglions hemmt die Entwicklung des Embryos im Ei in der Blastokinese (etwa Mitte der Embryonalentwicklung). Im Kurztag dagegen unterbleibt



Abbildung 13.49: Diapause beim Zünsler *Diatraea grandiosella* im Larvenstadium: Das Gehirn veranlaßt die Corpora allata, Juvenilhormon zu bilden und auszuschütten. Die Prothorakaldrüse schüttet aber kein Ecdyson aus. Der Stoffwechsel ist reduziert, der Körper enthält nur wenig Wasser, Fett wird gespeichert, die lokomotorische Aktivität reduziert. Es findet keine Metamorphose statt. Nach Yin and Chippendale (1973). E209n/larven-diapause

die Diapause des Embryos und die Tiere entwickeln sich weiter 13.3.6.

Am häufigsten findet die Diapause im *Puppen-stadium* statt. Das gilt vor allem für Lepidopteren und Dipteren. Auch hier ist der Stoffwechsel gedrosselt und die Mitochondrien sind weniger aktiv. Es findet keine Imaginaldifferenzierung statt.

Die Puppen sind meistens nicht mehr photoperiodisch empfindlich (das heißt, die photoperiodische Induktion der Puppendiapause geschieht in einem Larvenstadium). Aber auch hier gibt es Ausnahmen: Bei *Hyalophora cecropia* und *Antheraea pernyi* sind auch die Puppenstadien noch photoperiodisch empfindlich. Die Diapause kann durch Kurztag während der Puppenruhe verlängert, durch Langtag unterbrochen werden . Bei *Platysamia cecropia* ist das hormonelle Geschehen genauer bekannt (siehe Unterabschnitt 13.3.6).

## 13.3.17 Modifikation der Diapause

Die Diapause kann durch Faktoren wie Temperatur und Nahrungsangebot oder Qualität der Nahrung modifiziert werden. In der Regel hemmt hohe Temperatur die Diapause, während niedrige Temperatur sie fördert. In einigen Fällen sinkt die kritische Tageslänge mit steigender Temperatur. Bei *Megoura viciae* nimmt sie für 5<sup>0</sup> C höhere Temperatur um je 15 Minuten ab, bis bei 23<sup>0</sup>C keine Diapause mehr eintritt (Lees (1963)). Bei *Sarcophaga* dagegen bleibt die kritische Tageslänge bei unterschiedlichen Temperaturen konstant, tritt aber bei  $20^{0}$ C und höheren Temperaturen nicht mehr ein (Abbildung 13.50).

Andererseits gibt es auch Fälle, in denen die Diapause bei höheren Temperaturen eintritt, zum Beispiel bei *Abraxas miranda* (Masaki (1980)). Die Tiere entwickeln sich im Kurztag und bei niedriger Temperatur. Meistens



Abbildung 13.50: Diapause von Sarcophaga bei unterschiedlichen Temperaturen. Bei  $20^{0}$ C und höheren Temperaturen tritt keine Diapause mehr ein. Nach Saunders (1971). D210n/sarcophaga-diapause-t

gibt es optimale Temperaturen für die photoperiodische Induktion der Diapause. Tropische Arten haben meistens höhere Optimums-Temperaturen (*Oedipoda miniata*  $27 - 28^{0}$ C).

Auch die Nahrung kann die Diapause beeinflussen. Bei hohem Ölgehalt der Wirtspflanze (Baumwollsamen) wird die Diapause von *Pectinophora* erleichtert. Bei *Chaoborus* kann trotz Kurztag ein hohes Angebot von Nahrung die Diapause unterdrücken (Bradshaw (1970)).

## 13.3.18 Genetik der Diapause

Die Diapause der Insekten ist genetisch programmiert. Sie zeigt eine gewisse Variabilität, die sich zum Beispiel in geographischen Rassen mit verschiedenen kritischen Tageslängen niederschlägt (Abbildung 13.34). Kreuzungen zwischen einer nördlichen Rasse von *Drosophila littoralis* (Oulu) und einer südlichen Rasse (Kutaisi) zeigen intermediäres Verhalten (Abbildung 13.51, LUMME (1982)).



Abbildung 13.51: Kreuzungen (F1) zwischen einer nördlichen Rasse von *Drosophila littoralis* (Oulu, Finnland, 65<sup>0</sup>N) und einer südlichen Rasse (Kutaisi, Kaukasus, 42<sup>0</sup>N) haben eine intermediäre kritische Tageslänge (Oulu: 19 Stunden 42 Minuten; Kutaisi 12 Stunden 36 Minuten; F1 16 Stunden 18 Minuten) Nach LUMME (1982). D211/diapause-kreuzungen

# 13.4 Photoperiodische Kontrolle der Reproduktion bei Säugern

Übersichten über die photoperiodische Kontrolle der Reproduktion bei Säugern geben Hoffmann (1981a), Steinlechner and Niklowitz (1992), Heldmaier et al. (1989) und Goldman (2001).

Beschwerde-Kasten: Dieser Abschnitt ist sehr unvollkommen. Vielleicht könnten Herr Pohl oder Herr Steinlechner ihn überarbeiten/ausarbeiten?

# 13.4.1 Einführung und Übersicht

Die Säuger in den gemäßigten und höheren Breiten müssen sich an die Jahreszeiten anpassen, damit ihre Jungen unter günstigen Umweltbedingungen geboren und aufgezogen werden. Auch die Umgebungstemperaturen und das Nahrungsangebot ändern sich beträchtlich im Laufe eines Jahres. Deshalb müssen auch zahlreiche andere Funktionen wie zum Beispiel die Wärmeisolierung durch das Fell an den Jahresgang angepasst werden.

Kleine Säuger mit kurzer Tragzeit wie Wühlmäuse, Mäuse, Hamster und Frettchen paaren sich und setzen ihre Würfe im Frühjahr und Sommer. Größere Säuger wie Schafe, Ziegen und Rehe oder Säuger mit verzögerter Einnistung (Fledermäuse, Nerze und Dachs) paaren sich dagegen im Herbst oder Winter und bekommen ihre Jungen im darauf folgenden Frühjahr. Die Photoperiode ist der wichtigste Umweltfaktor, der den Jahresrhythmus der Reproduktion synchronisiert. Bei Säugern, die sich im Frühjahr paaren, entwickeln sich die Gonaden im Frühjahr (Rekrudeszenz), während sich im Kurztag die Gonaden rückentwickeln (*Regression*). Dagegen führt bei Säugern, die sich im Herbst oder Winter paaren, Kurztag zur Entwicklung der Gonaden und Langtag zu ihrer Regression. Auch das Körpergewicht, die Fellfarbe und -qualität und die Körpertemperatur-Regulation stehen unter photoperiodischer Kontrolle.

Wie werden zunächst an zwei Beispielen, dem syrischen Hamster und dem Djungarischen Hamster, photoperiodische Reaktionen kennen lernen. Die unterschiedlichen Anpassungen an Winterbedingungen werden dargestellt. Als Beispiel wird der Torpor und sein Anpassungswert diskutiert. Solche Anpassungen können variieren und Ausnahmen vom Durchschnitt der Population treten auf. Dann wollen wir fragen, wie Säuger die Tageslänge wahrnehmen, die Informationen weiterleiten und entscheiden, ob Kurztag oder Langtag herrscht. An dieser Stelle kommt der circadiane Uhrmechanismus ins Spiel. Wir werden verschiedene Modelle kennen lernen, die versuchen, photoperiodische Zeitmessung zu erklären. Schließlich müssen die photoperiodischen Reaktionen Änderungen in den Zielgeweben, Zielorganen und im endokrinen System bewirken. Auf diese Weise wird das reproduktive System, die Körpertemperatur-Regelung, die Wärmeisolierung und das Verhalten beeinflusst.

# 13.4.2 Einige ausgewählte Beispiele: Syrischer und Djungarischer Hamster

Als Beispiele für photoperiodische Steuerung der Reproduktion werden wir zwei Hamster nehmen, den syrischen und den Djungarischen. Sie sind beide leicht zu züchten und zu vermehren und sind gut untersucht. Durch ihre geringe Größe können sie in größerer Zahl in Konstanträumen mit kontrollierten Temperatur- und Lichtbedingungen gehalten werden. Bei ihnen wurde nicht nur die photoperiodische Steuerung der Fortpflanzung, sondern auch die der Fellfarbe, der Felldichte, des Körpergewichtes, der Körpertemperatur, des Torpors und des Winterschlaf untersucht. Allerdings gibt es hier auch endogene Jahresrhythmen, die diese Vorgänge beeinflussen (Kapitel 12.4). Häufig dient dann eine photoperiodische Reaktion zur Synchronisation der Jahresrhythmik mit der Umwelt.

# Syrischer Hamster, Systematik, Vorkommen, Lebensweise, Anpassungen an den Winter

Der Goldhamster oder syrische Hamster Mesocricetus auratus gehört zur Familie der Cricetidae (Wühler, Abbildung 13.52). Er gehört zu den Mittelhamstern und stammt aus der Umgebung von Aleppo. Nach dem zweiten Weltkrieg wurde er in Europa eingeführt und hat sich auch als Labortier eingebürgert. Der Östruszyklus beträgt bei Goldhamstern 4-5 Tage. So lange dauert die Vorbereitung des Uterus und des reproduktiven Systems, die befruchtete Eizelle zu ernähren. Am Tage der Ovulation laufen die Weibchen sehr lange ('läufig') (bis zu 16 km, sonst 1 km). Nach der Paarung dauert es nur 16 Tage, bis die Nachkommen geboren werden. Sie werden sehr rasch geschlechtsreif.



Abbildung 13.52: Goldhamster (=Syrischer Hamster) *Mesocricetus auratus (Cricetidae)*. Körperlänge 17 bis 18 cm. 231/mesocricetus

Während einer photoperiodisch empfindlichen Phase im Herbst bilden sich die Gonaden zurück (Abbildung 13.53). Anhaltender Kurztag unterdrückt die Reproduktion. Kurztag verzögert auch die Pubertät bei spät im Jahr geborenen Hamstern, induziert Torpor und Winterschlaf, ändert das Fellkleid und das Körpergewicht. Im Langtag entwickeln sich die Gonaden. Die kritische Tageslänge beträgt dabei 12.5 Stunden. Beim Djungarischen Hamster ist sie 13 Stunden. Obwohl noch im Kurztag (Januar bis März), hört die photoperiodisch empfindliche Phase auf und die photorefraktäre Phase beginnt. Offenbar wird durch den vorausgegangenen Kurztag ein endogener Intervall-Zeitmessvorgang in Gang gesetzt, der die Refraktärzeit induziert. Die Gonaden des Hamsters beginnen sich zu entwickeln und sind im März voll aktiv. Langtag ist nötig, um die Tiere wieder für Kurztag empfindlich zu machen (Goldman (2001)).

#### Phodopus: Vorkommen, Lebensweise

Die Zwerghamster *Phodopus sungorus* und *Phodopus campbelli* werden oft verwechselt, weil beide mit 'Sibirischer Hamster' oder 'Djungarischer Hamster' bezeichnet werden (Abbildung 12.14). Sie unterscheiden sich aber stark voneinander. So ist die Wirkung des Kurztages auf die Fortpflanzung von *Phodopus campbelli* weniger ausgeprägt, die Würfe größer und mehr Junge überleben (Ebeling (1994)).

#### Anpassungen an den Winter

Im Herbst werden die Djungarischen Hamster durch den Kurztag auf den Winter eingestimmt. Das Körpergewicht sinkt, die Gonaden bilden sich zurück, das Fell wird weiss und dicht<sup>7</sup>, es tritt Torpor auf, bei dem die Körpertemperatur vorübergehend auf niedrige Temperaturen abgesenkt wird. Niedrige Temperatur verstärkt den Kurztageffekt und es sind weniger Kurztage nötig, um zur photoperiodischen Reaktion zu führen<sup>8</sup>. Nach einiger Zeit im Kurztag hört die Regression auf und die Gonaden entwickeln sich wieder, das Körpergewicht nimmt zu und das Sommerkleid bildet sich aus (Abbildung 12.14). Diese 'Rekrudeszenz' geschieht bereits im Kurztag (Abbildung 13.54). Es ist also keine photoperiodische Reaktion, sondern (wahrscheinlich) ein endogen

 $<sup>^{7}</sup>$ Es isoliert besser als das braune Sommerkleid und hat bei niedrigen Windgeschwindigkeiten einen höheren Wärmewiderstand (Walsberg 1991).

 $<sup>^{8}</sup>$ Catecholamine scheinen bei diesem Temperatureffekt beteiligt zu sein (Heldmaier et al. (1989)).



Abbildung 13.53: Wirkung der Tageslänge auf den Syrischen Hamster *Mesocricetus auratus*. Während einer photosensitiven Phase bilden sich im September die Gonaden zurück (Gonadenfunktion senkrecht über der x-Achse). Anhaltende Kurztagbedingungen unterdrücken die Reproduktion (blaue Kurve). Obwohl noch im Kurztag, hört die photoperiodisch empfindliche Phase im Januar auf und die photorefraktäre Phase beginnt (Zeit zwischen den roten Vertikalen). Die Gonaden des Hamsters beginnen sich zu entwickeln und sind im März voll aktiv. Langtag ist nötig, um die Tiere wieder für Kurztag empfindlich zu machen. Nach Goldman (2001). E231A/mesocricetus-daylength

jahresperiodisch angelegtes Phänomen. Es findet bei Männchen und Weibchen statt (Lerchl (1993)).

Die photoperiodischen Informationen werden durch Melatoninsekretion des Pinealorgans übertragen. Ein einziger Langtag senkt bereits die Melatoninsekretion permanent ab. Offenbar wird der circadiane Oszillator durch diese Behandlung neu programmiert ('Neustart'). Sie hat somit einen Langzeiteffekt. Melatoningabe verhindert diesen Effekt (Finley et al. (1995)). Das Melatonin-produzierende neuronale Netz besitzt ein wirksames Licht-Gedächtnis (Lerchl (1995)).

## Torpor und seine Physiologie

Kleine Hamster können ihr Energiegleichgewicht während ungünstiger Zeiten durch einen besonderen Zustand, den Torpor, regeln. Torpor hilft individuell Futterverbrauch und Futtersuche zu kontrollieren. Während des Torpors wird der Energieverbrauch stark reduziert (Berger (1988), Berger (1993)). Auf diese Weise sind die Tiere in der Lage, auch im Winter in der sibirischen Steppe nach Futter zu suchen, ohne mehr Energie auszugeben, als wenn sie den ganzen Tag in ihrem Bau verbringen würden (Ruf and Heldmaier (1992)). Umgebungstemperatur und Nahrungsangebot sind wichtige Faktoren bei der Induktion des Torpors. Die Tiere können auf diese Weise flexibel auf Umweltbedingungen und unvorhersehbare Wetteränderungen reagieren (Ruf et al. (1993), Ruf and Heldmaier (1992)). Der Hauptfaktor für das Auftreten von Torpor ist allerdings Kurztag.

Auch beim Djungarischen Hamster steht der Torpor unter photoperiodischer Kontrolle. Im Kurztag und bei niedriger Außentemperatur wird die Körpertemperatur für im Mittel 5.4 Stunden (0.3 bis 9.4h) pro Tag auf  $14 - 31^{0}$ C abgesenkt (Abbildung 13.54)<sup>9</sup>. Der Energieverbrauch wird im Torpor stark gesenkt. Auf diese Weise können die Tiere in der sibirischen Steppe auch im Winter nach Futter suchen, ohne mehr Energie auszugeben, als wenn sie sich den ganzen Tag im Bau befinden (Ruf and Heldmaier (1992)).



Abbildung 13.54: Torpor bei zwei Djungarischen Hamstern. Körpertemperatur von Hamster 1 (rote Kurve) für zwei, von Hamster 2 (blaue Kurve) für 3 Tage gemessen. Beide Hamster im Winterfell, Hamster 1 vom 18. bis 20. Januar, Hamster 2 vom 14. bis 17. November gemessen. Kühlraum mit  $6^{0}$ C Umgebungstemperatur mit 80 Lux Licht von 6-18 Uhr und 0.2 Lux Licht zur übrigen Zeit. Die Tiere wurden am frühen Morgen lethargisch (Torpor) und senkten ihre Körpertemperatur für einige Stunden pro Tag auf 18 – 20<sup>0</sup>C ab (Hamster 2 am zweiten Tag nur wenige Grad). Nach Figala et al. (1973). 234A/torpor

Je länger die Tiere im Kurztag waren, umso häufiger trat Torpor auf. Nach 130 Tagen Kurztag gab es ein Maximum der Torporhäufigkeit. Männliche Tiere zeigten übrigens häufiger Torpor als Weibchen. Ein circadianer Rhythmus kontrolliert das zeitliche Auftreten des Torpor und der Tag-Nacht-Zyklus synchronisiert

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup>Beim echten Winterschlaf hingegen kann die Körpertemperatur bis auf fast  $0^{0}$ C sinken (Barnes (1989)).

den Torporrhythmus. Im Dauerdunkel steigt die Torporhäufigkeit an (Kirsch (1991)). Damit Torpor im Kurztag eintritt, müssen die Testikel rückgebildet sein. Wird im Kurztag Testosteron injiziert, wird Torpor völlig unterbunden. Der jahreszeitliche Zeitmeßvorgang, der den Torpor steuert, ist jedoch unbeeinflusst. Bei kastrierten Tieren hört der Torpor später auf (Ouarour et al. (1991)). Kastration zwischen der ersten Woche vor und der vierten nach Kurztag-Beginn fördert das Auftreten von Torpor (Ouarour et al. (1995)).

Schlaf, Torpor und Winterschlaf wurden bisher als homologe Vorgänge aufgefasst. Beim Djungarischen Hamster wird aber nach Torpor die slow-wave Aktivität (mit einer EEG power density von 0.75-4.0 Hz) erhöht. Das gleiche geschieht nach Schlafentzug. Im Torpor erfährt demnach das Tier Schlafmangel. Nach dem Torpor muss es durch erhöhte slow-wave Aktivität den Mangel ausgleichen (Deboer and Tobler (2000b)). Es gibt weitere Unterschiede (?).

#### Ausnahmen

Bei der photoperiodischen Steuerung von Vorgängen beim Hamster gibt es eine ganze Reihe von Ausnahmen. Zunächst einmal ist die Anpassung an den Winter innerhalb der Art stark variabel (Ruf et al. (1993)). Normalerweise reagieren Djungarische Hamster mit einer Reihe von physiologischen und Verhaltens-Änderungen auf Kurztag, wie bereits erwähnt. Aber nicht alle Tiere reagieren in gleicher Weise auf die Photoperiode und bei manchen Tieren fehlt sie völlig. Es wird vermutet (Kliman and Lynch (1992)), dass für die photoperiodische Reaktion das circadiane System verantwortlich ist, aber ein zusätzliches System hinzukommt (reduzierte Empfindlichkeit auf Melatonin, Horton and Yellon (2001)), dessen Stärke genetisch variiert.

Gorman and Zucker (1997) zeigten, dass die photoperiodische Vorgeschichte für die reproduktive Regression wichtig ist. 92% der im 18:6 Licht-Dunkel-Wechsel gehaltenen Tiere bildeten ihre Gonaden nicht völlig zurück, während nur 10% der im 14:10 Licht-Dunkel-Wechsel gehaltenen Tiere das taten und kein einziges der im 10:14 Licht-Dunkel-Wechsel gehaltenen Tiere.

#### Photoperiodische Zeitmessung, Modelle

Damit sich Verhalten und Physiologie eines Tieres an die jahreszeitlichen Änderungen anpassen kann, müssen Zeitgeber wirken. Der verlässlichste ist die Länge der täglichen Lichtperiode (oder Dunkelperiode), die sich ja im Laufe des Jahres in bestimmter Weise ändert. Am ausgeprägtesten sind diese Änderungen in höheren Breiten, während sie in Äquatornähe viel geringer sind. Irgendwie muss die Länge des Tages beziehungsweise der Nacht bestimmt werden. Ein Signal wird erzeugt, das dem Tier mitteilt, die photoperiodische Reaktion zu starten.

Wir sahen bereits (Kapitel 12), dass auch eine innere Jahresuhr ein Tier an die Jahreszeit erinnern kann. Aber auch in diesem Fall muss der Jahresrhythmus auf die Jahreszeit synchronisiert werden. Sonst würde er bald seine Synchronisation mit der Jahreszeit verlieren. In den meisten Fällen ist auch hier die photoperiodische Situation Bezugswert.

Es sind somit Photorezeptoren und ein photoperiodisches Zeitmeßsystem nötig. Letzteres könnte wie eine Sanduhr funktionieren, indem zum Beispiel die Länge der Nacht zu photoperiodischer Induktion der Reproduktion führt, wenn eine kritische Länge erreicht oder überschritten wurde. Es wurde jedoch gefunden, dass eine circadiane Uhr die Nachtlänge misst<sup>10</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup>Die circadiane Hauptuhr der Säuger liegt im SCN. Wird es zerstört, verschwinden die circadianen Rhythmen, aber auch die photoperiodischen Reaktionen (Ru-

Wie in Abschnitt 20.18 diskutiert, wurden mehrere Modelle vorgeschlagen, um zu erklären, wie die photoperiodische Zeitmessung funktioniert. Ein externes Koinzidenzmodell würde in Frage kommen, bei dem der circadiane Oszillator zu bestimmten Phasen belichtet werden muss und zu anderen Phasen im Dunkeln bleiben muss, damit die photoperiodische Induktion stattfindet. Aber ein internes Koinzidenzmodell mit zwei Oszillatoren, die unabhängig von zwei verschiedenen äußeren, mit der Tageslänge verbundenen Zeitgebern beeinflusst werden,<sup>11</sup> könnten ebenfalls Grundlage des photoperiodischen Zeitmeßsystem sein. Immer häufiger findet man bei untersuchten Systemen, dass zwei Oszillatoren das circadiane System bilden (Boulos and Rusak (1982), Illnerova (1991), siehe auch neuere Ergebnisse zum SCN mit Morgen- und Abendoszillatoren von I et al. (2001)).

Die photoperiodischen Reaktionen des Djungarischen Hamsters können sowohl durch ein externes als auch durch ein internes Koinzidenzmodell erklärt werden (siehe Goldman (2001)). Ein internes Koinzidenzmodell scheint jedoch besser zu sein (siehe Abbildung 13.55 und Illnerova (1991), D et al. (2001), Boulos and Rusak (1982), I et al. (2001)). Dafür sprechen Experimente mit Licht von 0.5 Stunden Dauer, das alle 23.0 bis 25.3 Stunden zwei verschiedenen Phänotypen gegeben wurde: Der eine folgt einem 9:15 Kurztag, der andere nicht (Puchalski and Lynch (1994)). Genaueres und Unterschiede zwischen dem externen und internen Koinzidenzmodell in Abschnitt 20.18.



Abbildung 13.55: Internes Koinzidenzmodell, um die photoperiodischen Reaktionen des Djungarischen Hamsters zu erklären. 235/phodopus-modell

# 13.5 Photoperiodismus bei der Wachtel

Beschwerde-Kasten: Ich frage mich, ob die Wachtel nicht in Bezug auf circadiane Rhythmen zu ungewöhnlich ist und deshalb der Star oder Sperling sich als Beispiel mehr eignen würde.

Die photoperiodische Kontrolle der Fortpflanzung bei Säugern und Vögeln hat eine Reihe von Gemeinsamkeiten. Es gibt aber auch Unterschiede, die zum Teil auf der Biologie dieser beiden Klassen der Vertebraten beruhen (zum Beispiel die Anpassung der Vögel an den Flug durch geringes Gewicht, Federn, keine Milch). Im Gegensatz zu den Säugern benötigen die Vögel keine Augen für die photoperiodische Steuerung der Reproduktion und sie verwenden nicht Melatonin als Signal der photoperiodischen Situation.

Im Einzelnen findet man folgende Unterschiede:

• Die Gonadengrösse schwankt bei Vögeln im Lauf des Jahres sehr viel stärker als die der Säuger. Während sie bei Vögeln um das mehrere hundertfache schwanken kann, ist es bei Säugern viel weniger

sak and Morin (1976), Stetson and Watson-Whitmyre (1976)).

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup>zum Beispiel Lichtbeginn als einer der Zeitgeber, und Dunkelbeginn als ein zweiter

(Schaf: 2.5 fach, Syrischer Hamster: 3-5 fach). Das liegt daran, dass bei Vögeln die Hypothalamus-Hypophysen-Achse rigoros abgeschaltet wird. Dadurch kommt es zu einer stärkeren Regression. Der Vorteil für Vögel liegt auf der Hand, da die Körpermasse möglichst niedrig sein sollte. Fledermäuse als fliegende Säuger zeigen eine ähnliche Tendenz.

- Die Brutzeit ist bei Vögeln kürzer als bei Säugern. Sie ist auf die Zeit reichen Nahrungsangebots beschränkt und dadurch asymmetrisch zur Photoperiode. Damit wird die Brutzeit beendet, wenn die Tage länger sind als zu der Zeit, als sie induziert wurde. Ausnahmen sind die *Columbiformes*, die Milch füttern, und die Wachteln (siehe später).
- Die Mauser ist auf die Zeit mit reichlichem Nahrungsangebot beschränkt und beginnt unmittelbar nach der Brut. Sie ist für hohe Qualität des Gefieders und für den Flug entscheidend. Sie wird durch die Photoperiode induziert, aber eine längere Brutzeit verzögert den Beginn. In diesem Fall wird jedoch die Mauser beschleunigt (auf Kosten schlechterer Federqualität).

Die meisten Vögel entwickeln ihre Gonaden im Langtag. Die photoperiodische Steuerung der sexuellen Aktivität erfolgt je nach der Länge der Brutzeit unterschiedlich (Abbildung 13.56). Bei Vögeln der gemäßigten Zonen mit langer Brutzeit, die nicht ziehen, wird der Beginn und das Ende der Brutzeit photoperiodisch kontrolliert. Bei anderen Vögeln in den gemäßigten Zonen wird die Brutzeit photoperiodisch induziert und durch negative Rückkopplung beendet. Bei Zugvögeln höherer Breiten wird die Brutzeit photoperiodisch induziert und durch eine Refraktärzeit beendet, in der sie nicht mehr photoperiodisch reagieren. Die Wachteln gehören zu letzterer Gruppe. Ihre photoperiodische Reaktion lässt sich besonders gut untersuchen: Die Tiere reagieren bereits auf einen einzigen Langtag. Statt zu warten, bis die Gonadenentwicklung sichtbar ist, kann die Konzentration des Luteinisierenden Hormons (LH) im Blut als ein früher Zeiger benutzt werden<sup>12</sup>. Außerdem lassen sich die Tiere gut halten und schmecken vorzüglich. Deshalb sind an Wachteln zahlreiche Untersuchungen gemacht worden.

### 13.5.1 Systematik, Lebensweise

Coturnix coturnix coturnix und Coturnix coturnix japonica gehören zu den Hühnervögeln (Galliformes). Diese Ordnung besteht aus 7 Familien mit 250 Arten. Die Familie der Fasanvögel (Pasianidae) hat 170 Arten, unter ihnen die Wachtel. Sie ist etwa 20 cm groß, hat eine braune Schutzfarbe und kommt in Eurasien vom Atlantik bis Japan vor. Im Tibet trifft man sie noch in 3000 Meter Höhe an. Auch in Nordwestafrika, Südafrika und Madagaskar ist sie verbreitet. In Mitteleuropa kommen die Vögel im Mai an und fliegen im August/September nach Nord- und Mittelafrika, wo sie überwintern.

Das Verhalten der japanischen Wachtel wurde unter anderem von Mills et al. (1997) untersucht.

# 13.5.2 Photoperiodische Steuerung der Reproduktion

Die Reproduktion der Wachteln unterliegt einem endogenen Jahresrhythmus. Dieser wird photoperiodisch auf die Jahreszeit synchronisiert. Die photoperiodische Wirkung lässt

 $<sup>^{12}\</sup>mathrm{LH}$  kontrolliert bei Vertebraten das Gonadenwachstum


Abbildung 13.56: Photoperiodische Steuerung der sexuellen Aktivität: a) Bei Vögeln der gemäßigten Zonen mit langer Brutzeit, die nicht ziehen, wird der Beginn und das Ende der Brutzeit photoperiodisch kontrolliert. b) Bei anderen Vögeln in den gemäßigten Zonen wird die Brutzeit durch negative Rückkopplung beendet. c) Bei Zugvögeln höherer Breiten wird die Brutzeit durch eine photoperiodische Refraktärzeit beendet. Nach A33 (n.d.). E236/pp-brut



Abbildung 13.57: Photoperiodische Reaktionen der Wachtel. Oben links Tageslänge als Funktion der Jahreszeit für eine geographische Breite von xx . Mitte links: Testisgewicht, unten links Größe der Kloakendrüse, oben rechts FSH, Mitte rechts LH, und unten rechts Testosteron, alles als Funktion der Jahreszeit. Nach A34 (n.d.) E236A/pp-brut

sich an folgenden 'Zeigern' ablesen (Abbildung 13.57):

- Körpergewicht,
- Größe der Kloakendrüse,
- Testikelvolumen und Zahl der Spermatozoen
- Aktivität
- Durchmesser der Ovarfollikel
- Luteinisierendes Hormon LH
- Prolaktin
- Eiproduktion

Die Kloakendrüse kann leicht von außen gemessen werden. Das Volumen der Testikel lässt sich durch palpieren bestimmen. Die Aktivität der Tiere lässt sich sehr einfach mit Wackelkäfigen messen. LH kann über radioimmunologische Methoden im  $\mu$ l-Bereich im Blut bestimmt werden. Prolaktin steuert die Fettablage. Fett ist für den Zug wichtig. Von praktischer Bedeutung ist die Rate der Eiablage. Sie hängt von der Tageslänge, Lichtintensität und Zyklenlänge ab.

Als Zeiger des Erfolgs einer photoperiodischen Behandlung wird oft LH benutzt. Seine Konzentration steigt mit der Langtag-Behandlung. Schon 22 Stunden nach Beginn der Belichtung erreicht es ein Maximum, welches für drei Wochen anhält. Gibt es noch frühere Zeichen für einen Langtageffekt als LH? Da GnRH des Hypothalamus die LH Sekretion in der Hypophyse triggert, wurde untersucht, ab wann nach der photoperiodischen Induktion die GnRH Sekretion beginnt. Der Zeitunterschied zwischen dem Releasing Hormone und dem LH war jedoch gering. Dagegen wird C-fos schon 18 Stunden nach Beginn des Langtages produziert, also 4 Stunden vor dem Anstieg des LH. Wachteln werden ab einer kritischen Tageslänge im Langtag reproduktiv. Nach einer gewissen Zeit werden sie dann photoperiodisch refraktär, auch wenn noch Langtag herrscht. Sie brauchen jetzt Kurztag, damit sie wieder auf einen Langtag photoperiodisch reagieren können<sup>13</sup>. Kurztag lässt sich durch einen Wechsel von hoher und niedriger Temperatur ersetzen.

Japanische Wachteln wurden unter natürlichen Temperatur- und Lichtbedingungen gehalten und die LH Konzentration im Blut wöchentlich bestimmt. Sie steigt, wenn die Lichtperiode im Frühjahr länger als 12h ist. Im September sinkt trotz Langtag (14:10h Licht-Dunkel-Wechsel) die LH Konzentration und die Gonaden bilden sich zurück (Wada et al. (1992)). Dabei spielt offenbar ein circadianer und ein Jahresrhythmus eine Rolle. Das zeigt sich, wenn Wachteln nach der Geburt 4 Jahre lang bei  $20^{0}$ C im 12:12 Licht-Dunkel-Wechsel gehalten und beobachtet werden. Im ersten Jahr setzen die Tiere nach der ersten postjuvenilen Mauser Fett an. Sie haben dann eine Periode erhöhter nächtlicher Aktivität. In der Natur würden sie in dieser Zeit ziehen. Ab dem vierten Monat beginnt die sexuelle Entwicklung. Es folgt die zweite postjuvenile Mauser und dann für 6 Monate die Zeit der Reproduktion. Die Vorgänge wiederholen sich in den folgenden drei Jahren (Abbildung 13.58). In der Natur hängt die sexuelle Entwicklung von abiotischen Umweltfaktoren und sozialen Faktoren ab (Guyomarc'h and Guyomarc'h (1995)). Dabei wird der Jahresrhythmus nicht nur durch die Photoperiode synchronisiert, sondern auch moduliert. Der zeitliche Ablauf der Mauser kann ziemlich variieren, aber ein typischer Verlauf

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup>Wird im Experiment eine Woche Kurztag gegeben, sind die Vögel noch nicht auf Langtag empfindlich. Mit zwei Wochen Kurztag sind sie etwas, mit drei Wochen stark empfindlich und mit 5 Wochen reagieren alle Tiere. Es handelt sich also um eine graduelle und nicht um eine alles-oder-nichts-Reaktion (Follett and Pearce (1990)).



Abbildung 13.58: Jahresrhythmus der europäischen Wachtel während fünf Jahren unter künstlichem 12:12 stündigem Licht-Dunkel-Wechsel. Im ersten Jahr (geboren im August) würden die Wachteln nach einer Periode zum Fettansatz (nächtliche Zugunruhe in der zehnten Woche, rot) nach post-juveniler Mauser (grün) ziehen. Auf die Reproduktion (blau) folgt eine zweite juvenile Mauser (grün rechts). In den folgenden Jahren Reproduktion, prenuptiale Mauser, Reproduktion und post-nuptiale Mauser.

Unter natürlichen Bedingungen folgt der sexuellen Regression die post-nuptiale Mauser bei den über einjährigen Adulttieren (unterste Reihe, Ende Juli oder Anfang August, grün). In 60% besteht diese post-nuptiale Mauser (grün) aus zwei Phasen, mit einer Fettansatz-Phase zwischen den Mausern, und dauert etwa 4.5-5 Monate. Es folgen vier bis fünf Wochen nächtlicher Zugunruhe (rot). Nach Guyomarc 'h and Guyomarc 'h (1995). D237/jr-wachtel ist der folgende: Die erste Phase der postjuvenilen Mauser dauert etwa vier Wochen. Es folgen vier bis fünf Wochen Zugunruhe. Die zweite postjuvenile Mauser beansprucht vier bis fünf Wochen. Ende Dezember oder Anfang Januar beginnt die pränuptiale Mauser und dauert acht plus/minus vier Wochen je nach der sexuellen Entwicklung. Für ausgewachsene Tiere nach dem ersten Jahr sind die Vorgänge in Abbildung 13.58 in der letzten Reihe dargestellt.

### 13.5.3 'Hardware'

Die 'Hardware', die photoperiodischen Reaktionen der Wachtel und anderen Vertebraten zu Grunde liegt, ist bisher nicht gut bekannt. Ein neueres Modell für Säuger und Vögel ist in Abbildung 13.59 dargestellt. Bei Säugern wird Licht über die Retina der Augen perzipiert und beeinflusst das photoperiodische Zeitmess-System über das SCN. Je nach der photoperiodischen Situation wird die Funktion der Gonaden über einige sekundäre Prozesse gesteuert, die durch das photoperiodische Signal in Gang gesetzt wurden. Die Wege dieser Signale sind kompliziert und unterscheiden sich bei Säugern und Vögeln. Die Interaktionen ('das Spiel') der verschiedenen Spieler (Augen, SCN, Pinealorgan, Gonaden) sind in Abbildung 13.60 für Säuger (schwarz) und Vögel (rot) angedeutet.

Sie besteht aus Photorezeptoren für das photoperiodisch wirkende Licht, einem Zeitmess-System für die Photoperiode, und aus Folgeprozessen, die durch die photoperiodischen Signale in Gang gesetzt werden und schließlich zur sexuellen Aktivität führen. Sie werden im folgenden beschrieben.

### Rezeptoren des photoperiodisch wirkenden Lichtes

Bei Säugern nehmen retinale Elemente der Augen das photoperiodisch wirkende Licht wahr



Abbildung 13.59: Kontrolle der Gonadenfunktion durch die Photoperiode (PP, gelber Pfeil) bei Säugern (schwarz und grün) und Vögeln. Die Tageslänge wird von der Retina der Augen an den suprachiasmatischen Kern (SCN) signalisiert. Neuronale Signale werden über Rückenmark und oberes Cervicalganglion (SCG) zum Pinealorgan (PIN) übertragen, wo Melatonin (grün) produziert und sekretiert wird. Die Nachtlänge bestimmt die Dauer der Melatoninsekretion und überträgt auf diese Weise die Photoperiode zum Hypothalamus. Neurosekretorische Zellen im Hypothalamus produzieren Gonadotropine releasing Hormone (GnRH, ein Dekapeptid, grün). Es gelangt über die Portalvene zur vorderen Hypophyse. Dort wird das luteinisierende Hormon (LH, grün) und das Follikel stimulierende Hormone (FSH, grün) produziert und gelangt zu den Gonaden. Sie veranlassen die Gonaden zu reifen und aktiv zu werden. Rot: Bei Vögeln wird das photoperiodische Signal extraretinal perzipiert und beeinflusst den Hypothalamus. Die Gonaden reifen unter dem Einfluss der Hypophyse, was bei Wachteln drei bis vier Wochen dauert. Danach werden die Tiere refraktär (Tyrosin abhängig) und die Gonaden inaktiv. Der Weg bei den Säugern über Rückenmark und Pinealorgan ist bei Vögeln nicht beteiligt. Nach A35 (n.d.a) 237A/pp-induction gonads

und leiten es weiter. Es sind also die gleichen Lichtempfänger, die die visuelle Umwelt abbilden. Ein Haussperling kann jedoch auch ohne Augen und Pinealorgan noch durch einen Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert werden (Menaker and Underwood (1976)). Auch blinde Wachteln<sup>14</sup> können noch ihre Aktivität auf den Licht-Dunkel- Zyklus synchronisieren und photoperiodisch reagieren. Demnach können Wachteln für beide Aufgaben extraretinale Photorezeptoren verwenden. Das scheint allgemein für Vögel zu gelten, für verschiedene Fische, Amphibien und Reptilien (Follett (1993)). Bei diesen Vertebraten ist das Gehirn erstaunlich gut Licht-durchlässig. Photorezeptoren im Gehirn könnten daher die Lichtverhältnisse der Umwelt wahrnehmen.<sup>15</sup>

In Frage kommen das Pinealorgan, das Parapinealorgan, und Photorezeptoren an den Hirnventrikeln. Das Pinealorgan spielt beim Photoperiodismus von Vögeln keine oder nur eine geringe Rolle. Wird ein Pinealorgan einer Wachtel lokal einem Langtag ausgesetzt, wird das Gonadenwachstum nicht stimuliert (Homma et al. (1980)). Pinealektomie bei sonst intakten oder auch bei blinden Wachteln beeinflusst nicht die photoperiodische Reaktion (Simpson et al. (1983)). Beleuchtet man dagegen das Stammhirn über Faseroptik, hat Langtag einen photoperiodischen Effekt (Oliver and Bayle (1982), Yokoyama et al. (1978)). Neuronen mit Keulen-förmigen Fortsätzen, die in die cerebrospinale Flüssigkeit der Hirnventrikel ragen, kommen als Photorezeptoren in Frage (Wada et al. (2000), Schauer (1964), Vigh et al. (1982)). Abbildung 13.60 zeigt die verschiedenen Photorezeptoren und ihre Verbindungen zu den SCNs, die circadianen Ausgänge und Rückkopplungen dieser Ausgänge zum circadianen System.

Das Aktionsspektrum photoperiodisch wirksamen Lichtes hat ein Maximum bei 500 nm (Follett and Follett (1985)). Die Empfindlichkeit bei 500 nm betrug  $2.8 * 10^{12} \ \mu E/cm^2 sec.^{16}$  Es dürfte sich beim Photorezeptor um Rhodopsin handeln, dessen Absorptionsmaximum bei 492 nm liegt.

### Zur photoperiodischen Zeitmessung wird das circadiane System verwendet

Nachdem der Licht-Dunkel-Wechsel von einem Rezeptor perzipiert wurde, muss vom Organismus entschieden werden, welche Tageslänge und/oder Nachtlänge herrscht. Ziemlich früh schlug Bünning (1936) vor, dass dazu das circadiane System verwendet wird. Auch bei der photoperiodischen Steuerung der sexuellen Aktivität von Vögeln gibt es Hinweise, dass die Zeitmessung mit Hilfe einer circadianen Uhr erfolgt. Werden zum Beispiel weissköpfige Sperlinge aus Kurztag-Bedingungen in eine lange Dunkelperiode von fünf Tagen gebracht und zu verschiedenen Zeiten einzelne Gruppen für 8 Stunden belichtet, wird die photoperiodische Induktion der Gonadenentwicklung nur zu bestimmten Zeiten erzielt (Abbildung 12.2.2). Licht muss die Tiere also zu geeigneten Zeiten innerhalb des circadianen Rhythmus treffen, um photoperiodisch wirksam zu sein. Auch bei Wachteln wurde das nachgewiesen. Allerdings sind hier die circadianen Schwankungen weniger stark ausgeprägt (Abbildung 6). Der Zeitraum, in dem Licht photoperiodisch induzierend wirkt, wird als photoinduktive Phase  $\Phi_i$  bezeichnet. Er liegt bei der Wachtel 12 bis 13 Stunden nach Beginn des Lichtes und dau-

 $<sup>^{14}</sup>$ Durch Formoguanamin HCl wurde die Retina zur Degeneration gebracht

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup>Die Augen spielen aber ebenfalls eine Rolle. Werden sie gegen Licht abgedeckt, zerfällt der Rhythmus in zwei Komponenten, eine  $(O_s)$  mit einer Periodenlänge von 22.7 Stunden und eine  $(O_l)$  mit einer Periodenlänge von 26.3 Stunden. Werden die Augen zerstört, sind die Tiere arrhythmisch (Underwood and Edmonds (1995)).

 $<sup>^{16}1\</sup>mu E/cm^2sec$ entspricht $1*10^{17} \rm Photonen$ 



Abbildung 13.60: Das circadiane System der japanischen Wachtel besteht aus okularen Oszillatoren (Augen) und den paarigen SCNs mit zwei Populationen von Oszillatorzellen (blaue und offene Kreise). Eine Population (offene Kreise) ist mit den okularen Oszillatoren über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) und über hormonelle Ausgänge (Melatonin) vom Auge gekoppelt. Die andere Population (blaue Kreise) steht unter Rückkopplungskontrolle der Fortpflanzungshormone (Steroide der Gonaden, vielleicht über Hormone-empfindliche Neuronen). Das Pinealorgan ist kein autonomer Oszillator. Es wird durch den Licht-Dunkel-Wechsel oder über neuronale Eingänge vom SCN getrieben und sekretiert Melatonin während der Dunkelperiode. Das circadiane System kontrolliert unter anderem die lokomotorische Aktivität, die Körpertemperatur und über Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden-Achse die Reproduktion. Die weiblichen Gonaden-Steroide koppeln zum SCN zurück. Licht beeinflusst das System (rote Pfeile) über Photorezeptoren im Pinealorgan, den Augen und in extraretinalen Strukturen. Nach Guyomarc 'h and Guyomarc 'h (1995) und Zivkovic et al. (2000). E238A/pr quail



\caption[Photoperiodische Induktion bei weissköpfigen Sperlingen]Weissköpfige Sperlinge(Zonotrichia leucophrys gambelii) wurden aus Kurztag-Bedingungen (8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkelheit) in eine lange Dunkelperiode von fünf Tagen gebracht. Zu verschiedenen Zeiten wurden einzelne Gruppen für 8 Stunden belichtet. Als Zeiger der photoperiodischen Induktion wurde die Konzentration des LH im Blut gemessen. Die photoperiodische Induktion der LH-Produktion erfolgt nur zu bestimmten Zeiten, die sich in einem circadianen Rhythmus wiederholen. Nach Follett et al. (1974). D239B/pp-sparrow



Abbildung 13.61:Wachteln wurden aus Kurztag-Bedingungen (6 Stunden Licht, 18 Stunden Dunkelheit) in eine lange Dunkelperiode von vier Tagen gebracht. Zu verschiedenen Zeiten wurden einzelne Gruppen für 10 Stunden belichtet. Als Zeiger der photoperiodischen Induktion wurde die Konzentration des LH Blut gemessen. Die photoperiodische im Induktion der LH-Produktion erfolgt nur zu bestimmten Zeiten, die sich in einem circadianen Rhythmus wiederholen. Nach Follett (1982). D239A/pp-wachtel

ert 4 bis 6 Stunden (Abbildung 13.62). Das circadiane System der Wachtel ist allerdings relativ schwach ausgeprägt. Auch gibt es Hinweise, dass andere circadiane Rhythmen wie der der lokomotorischen Aktivität und des Melatonins im Blut keine geeigneten Zeiger der circadianen Modulation der photoperiodischen Reaktion sind. Nach diesen Befunden besteht das circadiane System der Wachtel aus mehreren Oszillatoren. Einer dieser Oszillatoren steuert die photoperiodische Induktion der LH-Produktion, die letztlich zur Gonadenentwicklung führt. Dazu mehr im folgenden.



Abbildung 13.62: Dauer und Lage der photoinduktiven Phase  $\Phi_i$  bei der Wachtel. Die Tiere wurden im 6:18 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel gehalten. Verschiedenen Tieren wurde zu bestimmten Zeiten in der Dunkelperiode ein vierstündiger Lichtpuls verabreicht. Die photoperiodische Induktion wurde gemessen, indem nach 12 Stunden Dunkelheit die LH-Konzentrationen im Blut bestimmt wurden. Nach Follett (1982). 239C/wachtel-phi-i

### Hormonelle Folgen des Langtages

In der Hypophyse wird durch gonadotrophe Releasing Hormone (GnRH) LH und FSH ausgeschüttet.

Die photoperiodische Information "Langtag" wird über den Hypothalamus und die Hypophyse zu den Gonaden geleitet. Damit wird die Brutzeit eingeleitet. Sie ist jedoch in Bezug auf die Photoperiode unsymmetrisch: Während des Winters und im zeitigen Frühjahr ist die Konzentration des Gonadotropin releasing Hormons GnRH niedrig und die Gonaden unreif. Im späten Frühjahr stimuliert Langtag die GnRH Abgabe. In der Hypophyse triggert das gonadotrophe releasing Hormone (GnRH) die LH und FSH Sekretion, die Gonaden reifen und die Vögel beginnen zu brüten. Während sie noch unter Langtagbedingungen sind, wird das Brüten abgeschlossen und die Mauser induziert (siehe Abbildung 13.63). Später verschwindet dann das photorefraktäre Stadium und die GnRH Konzentration steigt an. Dieses Stadium entspricht wieder den prä-pubertären Bedingungen.

Folgende Gebiete des Hypothalamus sind für die photoperiodische Induktion der GnT-Abgabe wichtig: der ventrale und posteriore Teil des Infundibularkerns und das präoptische Gebiet. Von der Hypophyse werden die Zielorgane der reproduktiven Achse beeinflusst: Die LH Sekretion wird durch das LHRH bewirkt. Letzteres muss episodisch ausgeschüttet werden, und zwar im Stunden-Takt. Bei kürzerem Takt (10 Minuten) wird nur wenig LH ausgeschüttet, bei Dauergabe keins. Zwischen den einzelnen Stationen gibt es Rückkopplungen, zum Beispiel zwischen den Gonaden und der Hypophyse.

Um zu sehen, was passiert, wenn Wachteln aus dem Kurztag in Langtag überführt werden, kann man fos-artige Proteine<sup>17</sup>in den Neuronen vom Auge zum Gehirn verfolgen. Nach dem Übergang in Langtag steigt die Zahl der Neuronen mit fos-artigen Proteinen an. Sie führen über die mediane Eminenz mit dem Infundibularkern zum basalen tuberalen Hypothalamus. Ferner ändert sich die Dichte der Melatonin-Rezeptoren nach Übergang in Langtag in den

 $<sup>^{17}\</sup>mathrm{immediate}$  early genes



Abbildung 13.63: Asymmetrische Brutzeit bei der Wachtel: A. Während des Winters und im zeitigen Frühjahr ist die Konzentration des Gonadotropin releasing Hormons GnRH niedrig und die Gonaden unreif. B. Im späten Frühjahr stimuliert Langtag die GnRH Abgabe, die Gonaden reifen und die Vögel beginnen zu brüten. C. Während sie noch unter Langtagbedingungen sind, wird die GnRH Produktion beendet, das Refraktärstadium induziert und die Gonaden rückgebildet. D. Das Refraktärstadium verschwindet, die GnRH Konzentration steigt wieder an. B und C beschränken die Brutzeit. Sowohl B als auch C werden durch Langtag induziert, aber das Abschalten der GnRH Produktion während C dauert länger. 239Y/quail-breeding)

Kernen tektofugaler Bahnen. Diese sind wichtig für visuelle Muster, Lichtintensität, Lokalisation und Orientierung.

## 13.5.4 Was passiert nach der photoperiodischen Induktion?

Als Zeiger für die Wirkung der photoperiodischen Behandlung diente LH. Seine Konzentration nimmt als Folge einer Langtag-Behandlung zu. 22 Stunden nach Lichtbeginn erreicht sie ein Maximum, dass für drei Wochen anhält. Dieser 'carry over Effekt' ist auch von photoperiodisch induzierten Pflanzen bekannt: Ein induziertes Blatt behält diesen induktiven Zustand auch unter nicht-induktiven Bedingungen. Durch Pfropfen kann er auf nichtinduzierte Pflanzen übertragen werden.

Gibt es noch frühere Zeiger als das LH? Das GnRH des Hypothalamus bewirkt in der Hypophyse, dass LH ausgeschüttet wird. Deshalb wurde untersucht, wann nach der photoperiodischen Induktion das GnRH erscheint. Es gibt aber keinen größeren zeitlichen Unterschied zwischen dem Releasing Hormon und dem LH. Das cfos jedoch wird bereits 18 Stunden nach dem Beginn des induzierenden Langtages gebildet, also 4 Stunden vor dem LH-Anstieg.

#### 13.5.5 Melatonin und Pinealorgan

Signale des SCN gelangen zum Pinealorgan. Das Melatonin des Pinealorgans wird über das Blutsystem im Körper verteilt. Es gelangt so zur Harder'schen Drüse, in der es viele Melatonin-Rezeptoren gibt, und zu den Gonaden. Aber auch das cardio-pulmonare System (Herz, Lunge) hat zahlreiche Melatonin-Rezeptoren. Damit wird der in den verschiedenen Photoperioden unterschiedliche Energiebedarf peripherer Gewebe gesteuert. Melatonin gelangt auch über den Hypothalamus zur Hypophyse.

Kulturen vom Pinealorgan der Wachtel zeigen nur einen schwachen Melatonin-Rhythmus oder gar Arrhythmie im Dauerdunkel. Damit unterscheiden sich Wachtel von anderen Vögeln. Offenbar ist ihre circadiane Organisation anders.

Was ist nun das photoperiodische Signal bei Vögeln? Bei Säugern war es die Dauer des Melatonins, mit der die Länge der Dunkelperiode gemessen wurde. Bei Vögeln ist es aber nicht die Dauer. Vielmehr ist Melatonin nur Zeitgeber des circadianen Rhythmus. Es ist mit einem äußeren Zeitgeber (der Photoperiode) gekoppelt. Vögel haben demnach zwar auch einen Melatonin-Kalender, benutzen ihn aber nicht zum Messen der Photoperiode (zumindest nicht für die photoperiodische Steuerung der Reproduktion). Vielmehr dekodieren sie neuronale SCN-Signale, die die Photoperiode widerspiegeln (Follett et al. (1998)).

Melatonin findet man auch in der Retina der Augen<sup>18</sup>. Während der Lichtzeit ist die Konzentration niedrig, während der Dunkelzeit hoch. Unter Dauerdunkel-Bedingungen schwankt die Melatonin-Konzentration noch zwei Tage lang circadian. Im Dauerlicht ist kein Melatonin-Rhythmus zu beobachten. Der Melatonin-Rhythmus im Auge ist bereits bei schlüpfenden Wachteln zu finden. Der Melatonin-Rhythmus lässt sich in den beiden Augen unabhängig voneinander synchronisieren. Sowohl der Oszillator als auch der Photorezeptor für den Melatonin-Rhythmus befinden sich also in jedem Auge extra und die Melatonin-Rhythmen der beiden Augen sind nicht miteinander gekoppelt. Auch die sympathische Innervation des Auges vom oberen Cervicalganglion und vom Isthmo-optischen Kern des Mittelhirns sind ohne Einfluss auf den Melatonin-Rhythmus im Auge.

Melatonin verkürzt die Aktivität der Tiere. Bei niedriger Melatonin-Konzentration steigt die Aktivität und sie beginnt früher. Niedrige Melatonin-Konzentration ist Voraussetzung für den Beginn der Reproduktion.

Bei der indischen Dschungel-Wachtel *Perdicula* asiatica reagieren neben dem Pinealorgan auch die Harderschen Drüsen photoperiodisch. Letztere besitzen auch zahlreiche Melatonin-Rezeptoren. Das Gewicht der Pinealorgane, Hardersche Drüsen und Ovarien schwankt jahresrhythmisch mit einem Maximum Ende Mai für Hardersche Drüsen und Ovarien und einem Minimum für Pinealorgane. Im Mai ist das Wetter besonders günstig. Es besteht also eine inverse Beziehung zwischen Hardersche Drüsen und Ovarien einerseits und Pinealorganen andererseits. Parallel dazu verlaufen die Melatonin und 17- $\beta$ -Östradiol Werte und die Porphyrin-Werte in der Hardersche Drüsen.

## 13.5.6 Die circadiane Uhr als Grundlage der photoperiodischen Zeitmessung: Interne Koinzidenz

Bei Säugern und Vögeln wurde vermutet, dass ein externes Koinzidenzmodell die photoperiodischen Reaktionen erklären kann (siehe dazu auch unter Spezialthemen Abschnitt 20). Bei Wachteln steigt jedoch unabhängig von der Länge der Lichtperiode des Langtages die Konzentration des LH immer zur 20. Stunde an. Auch Nanda-Hamner-Versuche verlaufen anders als nach dem externen Koinzidenzmodell zu erwarten. Es wird vermutet, dass der circadiane Rhythmus der Wachtel nur wenig selbsterregt ist und schnell ausdämpft (Follett et al. (1998)). Dagegen scheint eine interne Koinzidenz wichtig zu sein. Die Neurotransmitter Serotonin und Dopamin schwanken beide circadian. Injiziert man sie entweder mit 8 oder 12 stündigem Abstand, wird im ersten Fall sogar im Langtag das Gonadenwachstum unterdrückt, während es im zweiten Fall zu einer verfrühten sexuellen Reife, Spermatogense und Eiproduktion kommt. Das spricht für ein internes Koinzidenzprinzip (Dubey and Haldar (1997)).

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup>Sowohl die Retina als auch die Pinealozyten werden während der Ontogenie aus gleichen Hirnregionen gebildet.

Mehrere circadiane Uhren könnten bei der Wachtel vorhanden sein: Die photoperiodische Empfindlichkeit schwankt circadian. Dieser photoperiodische Response-Rhythmus (PRR) wird aber von einem anderen circadianen Oszillator getrieben als der, der die lokomotorische Aktivität der Tiere steuert. Die Aktivität der Tiere kann daher nicht als Zeiger für die PRR benutzt werden. Ähnliches wurde auch an der Fliege *Calliphora* gefunden (Saunders (1998)).

# 13.6 Photoperiodismus beim Menschen und anderen Primaten?

Da die anatomischen und funktionellen Grundlagen des photoperiodischen Systems der Säuger sich auch bei Affen und beim Menschen finden, lag es auf der Hand, nach photoperiodischen Reaktionen in diesen Gruppen Ausschau zu halten. Hinweise und ihre Bedeutung geben Wehr (2001).

Saisonale Fortpflanzung ist unter Primaten weit verbreitet. Unter den Prosimiern sind die Alt- und Neuweltaffen Kurztag- und Langtagbrüter. Es gibt aber auch nicht-saisonale Brüter. Saisonales Brüten hängt von der Nahrung, der geographischen Breite und der Körpergröße ab. Die Geburt findet meistens kurz vor der Zeit statt, zu der die meiste Nahrung zur Verfügung steht. Allerdings scheint Photoperiodismus und nicht Nahrungsangebot der proximate Faktor zu sein, der von den Tieren benutzt wird, um den Geburtszeitpunkt festzulegen (Lindburg (1987)). Rhesusaffen sind Kurztagbrüter. Die Weibchen besitzen ein saisonales Ovulationsmuster, Paarungsverhalten, Konzeption, Körpergewicht und Menge an Sexualhormonen. Bei den Männchen schwanken Körpergewicht, Fettansatz und Testikelfunktionen ebenfalls saisonal. Dies steht offenbar unter jahresperiodischer Kontrolle, wird aber durch die Photoperiode synchronisiert. Circannuale Zyklen kontrollieren auch die Reproduktion beim Pinseläffchen und die Photoperiode synchronisiert den Rhythmus auf die richtige Jahreszeit.

Auch die Fortpflanzung beim Menschen wird von der Jahreszeit beeinflusst. Das zeigt sich bei Konzeptionsdaten, vor allem aus früheren Zeiten (siehe Abbildung 13.64 und Diskussion bei Wehr (2001)). Frauen, die zu bestimmten Jahreszeiten geboren wurden, zeigen eine stärkere Variation der Konzeptionszeiten im Verlauf des Jahres als andere Frauen. Es scheint Individuen in der Population zu geben, die empfindlicher auf jahreszeitliche Effekte reagieren als andere. Die Reproduktion beim Menschen scheint durch das Längerwerden der Tage im Frühling stimuliert zu werden. Die Durchschnittstemperatur, die ebenfalls mit der Jahreszeit schwankt, scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen.

Die saisonale affektive Krankheit SAD wurden bereits erwähnt (Unterabschnitt 2.12.2). Sie mag mit photoperiodischen Effekten verbunden sein.



Abbildung 13.64: Jährliche Schwankungen der Konzeption beim Menschen während geschichtlicher Perioden in England. Abweichungen vom Mittel. Man beachte, dass die Amplitude von den älteren (1539-1637, rot) zu den jüngeren Daten (1968-1983, blau) abnimmt. Die saisonalen Effekte sind in der letzten Periode stark reduziert. In dieser Zeit war künstliche Beleuchtung in den Häusern allgemeine Praxis. Nach Wehr (2001). D239F/conception

# Kapitel 14

# Uhren von *Drosophila*: Zeiger, Lokalisation, Steuerung

Drosophila zeigt eine Reihe von verschiedenen Rhythmen. Am intensivsten wurde das tagesperiodische Schlüpfen der Adulttiere aus dem Puparium und die Laufaktivitätsrhythmik der Fliegen untersucht. Wir werden uns mit beiden Rhythmen beschäftigen. Die Schlüpfrhythmik lässt sich nur an einer Population von verpuppten Fliegen nachweisen: Es ist ein einmaliger Vorgang im Rahmen der Entwicklung eines Tieres. Zu einer bestimmten Zeit in der Entwicklung wird durch eine Uhr ein Zeitfenster geöffnet. Nur während dieser Zeit kann eine Fliege schlüpfen. Es wird uns klar werden, warum die Tiere so ein Zeitfenster benutzen. Verschiedene Eigenschaften der Schlüpfuhr werden wir kennen lernen. Licht wird über extraretinale Photorezeptoren wahrgenommen und synchronisiert die Schlüpfrhythmik auf den Licht-Dunkel-Wechsel des Tages.

Auch die circadiane Laufaktivität wird über extraretinale Photorezeptoren synchronisiert. Unter konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen läuft der Rhythmus weiter. Ihre Periodenlänge ist aber bei den einzelnen Fliegen in der Regel nicht genau 24 Stunden, sondern kürzer oder länger. Außerdem hängt die Periode auch von der Lichtintensität ab. Verschiedene Mutanten wurden isoliert, deren circadiane Rhythmen verändert sind. Genetische und molekularbiologische Methoden wurden eingesetzt, um herauszufinden, wie die circadianen Mechanismen funktionieren. Bestimmte neurosekretorische Zellen im Gehirn sind die Zentren, über die die lokomotorische Aktivität gesteuert werden. Es wird ferner beschrieben, wie die Schlüpfrhythmen und die lokomotorische Aktivität registriert und analysiert werden können.

Beschwerde-Kasten: Ich hoffe, dass vielleicht Charlotte Förster den zweiten Teil dieses Kapitels übernimmt in einer späteren Version

# 14.1 Schlüpfen von Drosophila: Ein Populationsrhythmus

Fruchtfliegen *Drosophila* finden wir oft an faulendem Obst. Die Männchen balzen vor den Weibchen in charakteristischer Weise. Nach der Kopulation suchen die Weibchen eine geeignete Stelle, um Eier abzulegen. Die Larven ernähren sich von Hefezellen, wachsen und häuten sich dreimal. Am Ende des vierten Larvenstadiums kriechen die Tiere aus dem Futter und suchen trockenere Stellen auf. Sie bilden eine Puppenhülle (Puparium) und in ihr wandelt sich die Larve in eine Fliege um (Metamorphose). Sie drückt einen vorgeformten Deckel (Operculum) des Pupariums auf und gelangt ins Freie (Abbildung 14.1).



Abbildung 14.1: Lebenszyklus der Fruchtfliege Drosophila. Weibliche Fliege (oben) legt Eier (eins rechts gezeigt), aus denen Larven schlüpfen (drei Stadien, drittes Stadium links unten). Sie verpuppen sich in einem Puparium (Mitte links) und verwandeln sich in eine Fliege (Metamorphose). Nach Geibel (1987). 240/lebenszyklus.

Wir wollen nun am Beispiel von Drosophila pseudoobscura das Schlüpfen der Tiere etwas genauer betrachten. Bei dieser Art aus den Südstaaten der USA ist vor allem durch Pittendrigh und seine Schüler (Pittendrigh (1954), Winfree (1986)) der zeitliche Verlauf des Schlüpfens untersucht worden. Wenn wir sehr viele Puppen beobachten, ist das Schlüpfen aus dem Puppengehäuse nicht gleichmäßig über den Tag verteilt. Es erfolgt vielmehr am frühen Morgen kurz nach Sonnenaufgang. Jede Fliege kann natürlich nur einmal schlüpfen. Sie benutzt dazu ein Zeitfenster (gate = Tor) von etwa 4 Stunden. Ist sie noch nicht schlüpfbereit, wartet sie bis zum nächsten Zeitfenster am folgenden Tag, um dann zu schlüpfen. Abbildung 14.2 zeigt in der mittleren Kurve die Zahl der geschlüpften Tiere pro Stunde während einer Woche bei  $21^{0}$ C. Jeden Tag beobachten wir in den ersten vier Stunden nach Lichtbeginn hohe Schlüpfraten. Nachmittags und nachts schlüpfen keine Tiere.

Zwei Fragen drängen sich auf:

- Warum schlüpfen die Tiere nur in Zeitfenstern?
- Woher wissen die Tiere, dass jetzt das Zeitfenster beginnt?

### 14.1.1 Zeitfenster werden von einer Tagesuhr bestimmt

Die erste Frage ist nicht leicht zu beantworten. Wir werden später darauf zurückkommen. Zur zweiten Frage können wir uns ein paar Hypothesen bilden und sie durch Experimente testen.

Hypothese 1: Mit der Morgensonne wird es wärmer. Die steigende Temperatur veranlasst die Tiere, zu schlüpfen (wenn sie weit genug entwickelt sind). Wir prüfen diese Hypothese in einem Raum mit konstanter Temperatur. Das Sonnenlicht ersetzen wir durch eine weiße Leuchtstoffröhre. Sie wird durch eine Schaltuhr für 12 Stunden angeschaltete und danach für 12 Stunden abgeschaltet. Ergebnis: Trotz konstanter Temperatur schlüpfen die Tiere weiterhin in den ersten Stunden nach Lichtbeginn. Das gehäufte Schlüpfen beruht also nicht auf einer erhöhten Temperatur.



Abbildung 14.2: Zahl der geschlüpften *Drosophila*-Fliegen pro Stunde während einer Woche bei drei verschiedenen Temperaturen. Zunächst wurden die Kulturen für zwei Tage im 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel gehalten. In den ersten vier Stunden nach Lichtbeginn hohe Schlüpfraten, nachmittags und nachts schlüpfen keine Tiere. Danach wurde das Schlüpfen in schwachem Dauer-Rotlicht gemessen. Die Fliegen schlüpfen weiterhin tagesperiodisch. Die Periodenlänge ist bei allen drei Temperaturen fast gleich und zeigt somit die Temperaturkompensation des Schlüpfrhythmus. Nach Maier (1973). D242/tkomp-dros

Hypothese 2: Das Licht am Morgen ist für die erhöhte Schlüpfrate verantwortlich. Auch diese Hypothese ist überprüfbar. Wir bringen unterschiedlich alte Puppen, die in den nächsten Tagen schlüpfen werden, nach einer 12 stündigen Lichtperiode nicht in Dunkelheit, sondern in schwaches Rotlicht. Es bleibt während der gesamten Beobachtungszeit an. Für die Tiere ist das Rotlicht wie Dunkelheit (Sicherheitslicht). Wir können aber das Schlüpfen der Tiere im Rotlicht beobachten. Erstaunlicherweise schlüpfen wieder viele Fliegen in einem vierstündigen Zeitfenster kurz nach der Zeit, zu der normalerweise das Weisslicht angegangen wäre. Und wenn wir einen weiteren Tag beobachten, finden wir im 24 Stunden Takt Schlüpfmaxima. Es ist so, als ob die Tiere das Zeitfenster zum Schlüpfen auch ohne äußere Anhaltspunkte (Zeitgeber) benutzen können.

Hypothese 3: Die Tiere können Umweltfaktoren als Zeitgeber benutzen, die in unserer Kammer trotz konstanter Temperatur und Dauer-Rotlicht weiterhin im 24 Stunden Takt auftreten. Um das zu prüfen, geben wir unterschiedlich alten Puppen vor dem Schlüpfen einen inversen Licht-Dunkel-Wechsel: Die 12 Stunden Lichtperiode ist zur Nachtzeit, die Dunkelperiode zur Tagzeit. Die Tiere schlüpfen jetzt bevorzugt in den ersten Stunden nach Beginn der Lichtperiode, wenn also außen Nacht ist. Wenn wir nun nach der inversen Beleuchtung dauernd schwaches Rotlicht geben, schlüpfen die Tiere jeweils 24 Stunden nach den erhöhten Schlüpfraten des inversen Licht-Dunkel-Wechsels. Wären äußere Zeitgeber für das vierstündige Schlüpfmaximum verantwortlich, müssten diese im Dauer-Rotlicht das Schlüpfen auf die normale Schlüpfzeit bringen. Wir sehen also, dass ein Licht-Dunkel-Wechsel ein Zeitgeber für das Schlüpfen ist: Das rhythmische Schlüpfen lässt sich auf andere Tageszeiten verschieben. Aber unter konstanten Bedingungen läuft diese Rhythmik weiter, ohne von möglicherweise noch vorhandenen tagesperiodischen Außenfaktoren beeinflusst zu sein.

Wir müssen daraus schließen: Die Drosophila-Fliegen besitzen innere Uhren, die das Schlüpfen nur in bestimmten Zeitfenstern im 24-Stunden-Takt erlauben. Diese Uhren können durch den Licht-Dunkel-Wechsel verschoben werden.

# 14.1.2 Warum schlüpfen die Tiere nur in Zeitfenstern?

Wir versuchen nun, die erste Frage zu beantworten. Warum schlüpfen die *Drosophila*-Fliegen nur in Zeitfenstern? Dazu müssen wir uns die Biologie der Tiere ansehen. *Drosophila pseudoobscura* lebt in trockenen Gebieten der südlichen USA. Zum Verpuppen kriechen die Larven am Ende des vierten Larvenstadiums in den Boden. In einer Tiefe, in der weder Licht zu sehen ist noch Temperatur-Unterschiede auftreten, findet die Umwandlung zur Fliege statt. Sie ist nach 7 Tagen abgeschlossen. Die Fliegen kriechen zu Erdoberfläche. In den ersten Stunden härtet sich die Kutikula und die Tiere können danach fliegen.

Die noch nicht ausgehärtete Kutikula ist jedoch sehr Wasser-durchlässig. Das Schlüpfen muss deshalb zu einer Zeit erfolgen, zu der die Trockenheit der Luft nicht zu groß ist. Das ist am frühen Morgen der Fall. Die innere Uhr bestimmt das Zeitfenster zum Schlüpfen nach dem Ende der Metamorphose so, dass die Tiere zur günstigsten Tageszeit an die Oberfläche kommen. Da die Puppen etwa 7 Tage in der Erde sind, muss die Uhr ziemlich genau sein und exakt alle 24 Stunden das Zeitfenster öffnen. Übrigens ist die Schlüpfuhr ein ganz seltener Fall, bei dem der Takt genau 24 Stunden ist. Die meisten Tagesuhren laufen unter Konstantbedingungen nicht genau im 24-Stunden-Takt. Man spricht deshalb auch von circadian-Uhren (siehe 18.2).

### 14.1.3 Eigenschaften der Schlüpfuhr

Obwohl die Schlüpfrhythmik einen genauen 24-Stunden-Takt hat, gibt es auch bei ihr einen Hinweis darauf, dass es sich um eine innere Uhr handelt (bei einer Periodenlänge von genau 24 Stunden liegt immer der Verdacht nahe, dass ein versteckte Zeitgeber die Rhythmik treibt): Von Drosophila gibt es Mutanten, deren Uhr schneller ( $per^s$ ), oder langsamer ( $per^l$ ) läuft. Das äußert sich in einem kürzer als 24 Stunden Takt ( $per^s$ ) und einem länger als 24 Stunden Takt ( $per^l$ ) des tagesperiodischen Schlüpfens. Das Schlüpfen wird also tatsächlich von einer inneren Uhr kontrolliert.

Übrigens gibt es auch Mutanten, die früher als normal schlüpfen (early) oder später als normal (late) schlüpfen, obwohl die Periodenlänge der Schlüpfrhythmik unter Konstantbedingungen normal ist (ref). Offenbar ist in diesem Fall die Ankoppelung der Uhr an den Licht-Dunkel-Wechsel durch die Mutation geändert worden.

Uhren müssen neben einem Uhrwerk und der Stellbarkeit noch eine andere Eigenschaft haben: Sie dürfen bei höherer Temperatur nicht schneller, bei niedrigerer Temperatur nicht langsamer laufen. Das findet man auch tatsächlich bei der Schlüpfrhythmik (Abbildung 14.2). Im physiologischen Temperaturbereich ist das rhythmische Schlüpfen der Fliegen unabhängig von der Umgebungstemperatur immer im 24-Stunden Takt (Pittendrigh (1954)). Trotzdem kann die Temperatur einen Einfluss auf das Schlüpfen haben. Gibt man Puppen im Dauer-Rotlicht einen 12:12 Stunden Temperaturwechsel (von beispielsweise  $25^{0}/20^{0}$ C), kann der Schlüpfrhythmus dadurch synchronisiert werden (Abbildung 14.3). Auch ein *einzel*ner Temperaturpuls (zum Beispiel von 3 Stunden) kann den Rhythmus unter Konstantbedingungen verschieben.

Das gleiche gilt für einen einzelnen Lichtpuls. Seine Wirkung hängt von der Stärke und dem



Abbildung 14.3: Ein 12:12 Stunden Temperaturwechsel von  $25^0/20^0$ C synchronisiert den Schlüpfrhythmus von *Drosophila pseudoobscura*. Die Larven und Puppen wurden unter Dauer-Rotlicht gehalten. Nach Zimmerman et al. (1968). D243/t-syn-dros

Zeitpunkt der Darbietung ab. Sie kann aus Phasenresponsekurven abgelesen werden (Abbildung 14.4, Abbildung 14.5).

Zur subjektiven Mitternacht ist die Verschiebung des Rhythmus am stärksten, wenn der Lichtpuls stark ist. Winfree (Zusammenfassung in Winfree (1987)) konnte zeigen, dass ein bestimmter Lichtpuls zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt gegeben das rhythmische Schlüpfen unterbinden kann. Die Tiere schlüpfen jetzt zufallsverteilt. Dieser Zeitpunkt ist die subjektive Mitternacht. Der Lichtpuls muss gerade so stark sein, dass er zwischen starker und schwacher Reaktion liegt (siehe Abbildung 14.6). Arrhythmie konnte durch spezielle Störungen auch bei anderen circadianen Rhythmen erzeugt werden (Winfree (1987), Winfree (1980)).



Abbildung 14.4: Wirkung eines einzelnen Lichtpulses auf den circadianen Schlüpfrhythmus von *Drosophila pseudoobscura*. Obere Kurve: Kontrolle ohne Lichtpuls. D244A/T-L-pulse-dros



Abbildung 14.5: Wirkung einzelner Licht- und Temperaturpulse auf den Schlüpfrhythmus von *Drosophila pseudoobscura*. Viele Experimente in der Art, wie in Abbildung 14.4 gezeigt, wurden durchgeführt, um die Phasenverschiebungen des Lichtpulses als Funktion der Phase im circadianen Zyklus aufzutragen. Starke Lichtlichtpulse ergeben eine starke Phasenresponsekurve (rote Kurve) und schwache Lichtpulse eine schwache Phasenresponsekurve (blaue Kurve). D245/prclp-dros



Abbildung 14.6: Durch einen bestimmten Lichtpuls zu einem ganz bestimmten Phasenpunkt gegeben wird das rhythmische Schlüpfen von *Drosophila*-Fliegen aus dem Puparium unterbunden: Die Tiere schlüpfen zufallsverteilt. Der Lichtpuls (Blau, 500  $\mu W/cm^2sec$ ) muss gerade so stark sein, dass er zwischen starker und schwacher Reaktion liegt, und er muss zur subjektiven Mitternacht (CT 18.7) gegeben werden. 1000  $\mu W/cm^2sec$  oder 300  $\mu W/cm^2sec$  führen nicht zu Arrhythmie. Nach Chandrashekaran and Engelmann (1976). D246/ar-dros

### 14.1.4 Photorezeptoren zur Synchronisation der Schlüpfrhythmen

Da der Schlüpfrhythmus durch einen Licht-Dunkel-Wechsel und einen einzelnen Lichtpuls verschoben werden kann, müssen Lichtrezeptoren existieren, die das Lichtsignal an den Oszillator weiterleiten, der das Schlüpfen steuert. Wie finden wir heraus, welche das sind?

Die übliche Methode ist, ein Aktionsspektrum aufzustellen und dieses mit bekannten Absorptionsspektren verschiedener Pigmente zu vergleichen. Für ein Aktionsspektrum wird Farblicht auf den Organismus eingestrahlt und der Effekt ('Aktion') gemessen. Wenn Licht unwirksam ist, wird keine Wirkung zu beobachten sein. Je stärker eine bestimmte Wellenlänge wirkt, umso weniger Lichtenergie ist nötig, um den Effekt zu erhalten.

Wie erhält man ein Aktionsspektrum im Fall des Schlüpfrhythmus? Wir wissen, dass ein Lichtpuls die Phase des Schlüpfrhythmus verschiebt. Wir haben auch gelernt, dass die Richtung und die Größe der Phasenverschiebung von der Phase im Schlüpfzyklus abhängt, zu dem der Puls gegeben wird. Ein Lichtpuls kurz vor dem Mitternachtspunkt des Schlüpfrhythmus wird den Rhythmus verzögern, der gleiche Puls ein paar Stunden vorher gegeben wird ihn verfrühen.

Wir verwenden nun verschiedene Wellenlängen von Licht und unterschiedliche Energien und bestimmen eine Dosis-Effekt-Kurve für jede Farbe in einer bestimmten Phase (Abbildung 14.7). Je höher die Energie des Lichtes, umso stärker die Phasenverschiebung. Aus der Dosis-Effekt-Kurve können wir die Menge Licht einer bestimmten Wellenlänge bestimmen, die eine Phasenverschiebung von, sagen wir, vier Stunden bewirkt. Als nächstes tragen wir die Menge des Lichtes (zum Beispiel die Zahl der Quanten) auf, die wir brauchen, um diesen Effekt als Funktion der Wellenlänge hervorzurufen. Das ist ein Aktionsspektrum (Abbildung 14.8). Als nächstes vergleichen wir es mit einem Absorptionsspektrum. Wir würden dann vielleicht schlussfolgern, dass ein Flavoprotein für die Phasenverschiebung des Schlüpfrhythmus durch Licht verantwortlich ist.



Abbildung 14.8: Aktionsspektrum Phasenverschiebenden Lichtes beim Schlüpfrhythmus von *Drosophila*: Die Zahl der Quanten, die nötig sind, um den Rhythmus um vier Stunden zu verschieben, wurde aus Abbildung 14.7 abgelesen und reziprok als Maß für die Empfindlichkeit (y-Achse) gegen die Wellenlängen (x-Achse) aufgetragen. Einzelheiten in Helfrich-Förster and Engelmann (2002). D246B/ar-dros



Abbildung 14.7: Dosis-Effekt Kurven der Phasenverschiebung des Schlüpfens von Drosophila: Verschiedene Lichtintensitäten (x-Achse) unterschiedlicher Wellenlängen (siehe die Zahlen an den Kurven, in nm) wurden benutzt, um Gruppen von Puppen zu einer bestimmten Phase ihres circadianen Rhythmus (CT 17) zu bestrahlen. Zu diesem Zeitpunkt werden Phasenverzögerungen induziert, und höhere Intensitäten (mehr Quanten) verschieben stärker, wie die Steigung der Kurven zeigt. Bestimmte Wellenlängen wie 459 und 451 nm sind wirksamer als andere (zum Beispiel 384 und 395 nm). Das zeigt sich in der geringeren Zahl von Quanten, die zur Phasenverschiebung nötig sind. Die x-Achse ist logarithmisch. Solche Daten sind Grundlage für ein Aktionsspektrum in Abbildung 14.8. Einzelheiten in Helfrich-Förster and Engelmann (2002). d246A/dosis-effect

# 14.2 Laufaktivität von Drosophila wird circadian gesteuert

Wir wenden uns nun der lokomotorische Aktivität von *Drosophila* zu, die ebenfalls von einer circadianen Uhr kontrolliert wird. Sie kann mit Infrarot-Lichtschranken gemessen werden (Abbildung 14.9).

Im Beispiel der Abbildung 14.9 befand sich das Tier zunächst für 3 Tage in einem 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel (LD 12:12). Aktivität ist auf die Lichtperiode beschränkt. Der Licht-Dunkel-Wechsel hat die Uhr synchronisiert, die die lokomotorische Aktivität kontrolliert. Danach wurde die Fliege in konstantem schwachem Rotlicht gehalten. Jetzt zeigt sich die endogene Natur der Uhr: Da die Periodenlänge nicht genau 24 Stunden beträgt (im Gegensatz zum Schlüpfrhythmus), beginnt die Aktivität jeden Tag etwas früher (bei dieser Fliege; eine andere könnte eine langsamere Uhr haben und deshalb jeden Tag etwas später aktiv werden). Aus der Steigung kann die Periodenlänge bestimmt werden. Sie beträgt im Beispiel von 14.9 24.6 Stunden.

Mit verschiedenen Lichtintensitäten lässt sich die Periodenlänge beeinflussen <sup>1</sup> (Konopka et al. (1989)). Das steht im Gegensatz zur Temperatur. Wird diese variiert, bleibt die Periodenlänge (beinahe) konstant. Diese Temperaturkompensation circadianer Rhythmen ist schon beim Schlüpfrhythmus besprochen worden und eine charakteristische Eigenschaft (siehe Seite 38), die auch auf den Schlüpfrhythmus (siehe Abbildung 14.3) und den Aktivitätsrhythmus von Drosophila zutrifft (Konopka et al. (1989)).

Wird *Drosophila* vom Eistadium an im Dauerdunkel angezogen, zeigen sie trotzdem im Adultstadium einen circadianen Laufaktivitätsrhythmus. Er verläuft aber unter den einzelnen Fliegen nicht synchron. Der Rhythmus kann demnach auch ohne Lichtsignale induziert werden. Licht kann den Rhythmus der Tiere im Embryonalstadium nicht synchronisieren, wohl aber im ersten Larvenstadium (Sehgal et al. (1992)).

### 14.2.1 Mutanten

Beschwerdekasten: Muss noch ausgearbeitet und mit dem folgenden in Übereinstimmung gebracht werden

Verschiedene Mutanten, die Änderungen im Gehirn zeigen, unterscheiden sich vom Wildtyp durch ihr Aktivitätsmuster. Dafür gibt es ein besonderes Dokument. In diesem Dokument sind auch Augenmutanten aufgeführt. Vergleicht man sie mit dem Wildtyp, kann festgestellt werden, welche Photorezeptoren für die Synchronisation der lokomotorischen Aktivität verantwortlich sind (ref).

Mutanten von *Drosophila*, die sich in ihrem circadianen Aktivitätsmuster unterscheiden, spielten und spielen eine wichtige Rolle beim Versuch, den Mechanismus aufzuklären, der den circadianen Uhren zugrunde liegt. Die wichtigsten sind in Tabelle 14.1 zusammengestellt.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Dauerlicht über 10 Lux induziert Arrhythmie in der lokomotorischen Aktivität.



Abbildung 14.9: Links: Eine Drosophila Fliege wird in einem kleinen Käfig (eine Spektralphotometer-Küvette) mit durchsichtigem Plastikdeckel über der (rechts befindlichen) Öffnung gehalten. Ein Docht liefert Wasser aus einem darunter liegenden Gefäß, ein Stück Zucker dient als Futter. Unterbricht die Fliege die Lichtschranke aus einer Infrarotlicht emittierenden Diode (IR-LED, oben) und einem Phototransistor unter der Küvette, entsteht ein Signal, das verstärkt (>>) und mit Hilfe eines PC gespeichert und analysiert wird. Rechts: Aktogramm der Laufaktivität einer einzelnen Fliege von Drosophila melanogaster im Licht-Dunkel-Wechsel (LD 12:12) für die ersten 3 Tage und danach in konstantem schwachem Rotlicht (DD, Sicherheitslicht, physiologische Dunkelheit für die Fliege). Die rote Linie verbindet den Aktivitätsbeginn der Tage unter Freilauf-Bedingungen. Aus der Steigung wurde die Periodenlänge bestimmt. Sie beträgt bei dieser Fliege 24.6 Stunden. E248/actogram-dros

Mutante	Name	Protein im Wildtyp	Eigenschaft	Bemerkung	Referenz
$\mathrm{per}^{0}$	period 0	PER			
$\operatorname{per}^{s}$	period s	PER			
$\mathrm{per}^l$	period l	PER			
$\operatorname{tim}$	$\operatorname{timeless}$	TIM			
cyc	cycle	CYC			
dbt	doubletime	DBT			
rigui	rigui				

Tabelle 14.1: Wichtige Mutanten von *Drosophila melanogaster* mit geänderten Eigenschaften der circadianen Uhr

Augenmutanten wurden benutzt, um herauszufinden, welche Photorezeptoren für die Synchronisation der lokomotorischen Aktivität zuständig sind (Helfrich-Förster et al. (2001), Tabelle 14.2; siehe auch Unterabschnitt 14.2.4).

soprina menangasier beenmassen					
Mutant	Name	Protein im Wildtyp	Eigenschaft		
so	sine oculis				
sol	small optic lobe				
eya	eyes-absent				
oc	ocelliless				
dcry	Drosophila Cryptochrom	DCRY			
cry <sup>b</sup>	$\operatorname{crybaby}$	CRYB	kein funktionierendes Cryptochron		
norpA	no-receptor-potential-A	phospholipase C	L Transduktion in KA und OC		
glass					
disco	optische Ganglien blind disconnected		synchronisiert in LD, AR in DD		

Tabelle 14.2: Einige Augenmutanten, die die Synchronisation des circadianen Systems von Drosophila melanogaster beeinflussen

#### 14.2.2 Multioszillatorsystem

Von den zahlreichen Ereignissen, die bei Drosophila circadian kontrolliert werden, werden zwei Beispiele (die auch am intensivsten untersucht sind) vorgestellt: Schlüpf- und Laufrhythmen. Beides sind Verhaltensrhythmen. Nun fragen wir nach den sie steuernden Uhren. Erstens: Sind das im Falle der Schlüpf- und Laufrhythmen eine Uhr oder verschiedene? Wenn es verschiedene sind, wie stehen sie miteinander in Beziehung und wie interagieren sie miteinander? Zweitens: Wo sind sie lokalisiert (siehe Unterabschnitt 14.2.3)? Schließlich: Wie funktionieren diese Uhren (Unterabschnitt 14.2.5)?

Bei Drosophila werden periphere Gewebe und verschiedene Organe durch autonome circadiane Uhren kontrolliert.<sup>2</sup> Sie wurden in den Komplexaugen (Cheng and Hardin (1998)), in chemosensorischen Zellen der Antennen (Plautz et al. (1997), Krishnan et al. (1999)), in den Malphigischen Röhren (Hege et al. (1997), Giebultowicz et al. (2001)) und in den Prothorakaldrüsen gefunden (Emery et al. (1997)). Diese Zellen und Organe sind aber für den Schlüpf- und Aktivitätsrhythmus nicht wichtig. Schlüpfen und die lokomotorische Aktivität von Fliegen werden hingegen durch circadiane Zentren im Gehirn circadian kontrolliert. Zunächst muss daran erinnert werden, dass die Schlüpfuhr in der Puppe zur Geltung kommt. In ihr hat sich bei Drosophila pseudoobscura in 7 Tagen (bei  $20^{\circ}$ C) eine Larve in eine Fliege umgewandelt, und die Schlüpfuhr setzt das Zeitfenster für den Schlüpfvorgang. Wenn die Fliege geschlüpft ist, wird durch die Laufuhr

das Herumlaufen des Tieres auf den Tag beschränkt. Es sind ja Tag-aktive Tiere. Hält man die Tiere unter konstanten Bedingungen (beispielsweise schwaches Rotlicht), sind sie während ihres subjektiven Tages aktiv. Es könnte also die gleiche Uhr die beiden Vorgänge kontrollieren: Erst bestimmt sie das Zeitfenster zum Schlüpfen, dann das Zeitfenster für die Aktivität.

Werden Schlüpfen und lokomotorische Aktivität von der gleichen circadianen Uhr kontrolliert? Die Schlüpfrhythmen haben auch unter konstanten Bedingungen einen genauen 24-Stunden-Takt, und es wurde schon erklärt, warum das so ist. Die Laufuhren dagegen sind in konstanter Umwelt bei den einzelnen Fliegen meistens etwas schneller oder etwas langsamer als 24 Stunden. Das spricht zunächst gegen eine einzige Uhr, die beide Vorgänge steuert. Die Uhr könnte aber nach dem Schlüpfen ihre Geschwindigkeit ändern. Schlüpfen und Laufen würden dann immer noch von einer Uhr gesteuert. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Laufuhr schon in der Puppe läuft, und zwar mit einer anderen Geschwindigkeit als die Schlüpfuhr (Mack and Engelmann (1982)).

Andererseits haben Mutanten von Drosophila melanogaster, deren Schlüpfuhr schneller oder langsamer ist als die des Wildtyps, auch schnellere oder langsamere Laufuhren (Konopka and Benzer (1971)). Wenn die Mutation den Oszillator betrifft, würde das für eine Uhr sprechen, die beide Vorgänge circadian steuert. Es gibt aber auch eine Mutante (ebony), bei der der Laufrhythmus verändert ist, der Schlüpfrhythmus aber nicht (Newby and Jackson (1991)). Ähnliches wurde bei Drosophila pseudoobscura beobachtet (Engelmann and Mack (1978)). Als ein weiteres Beispiel wurde bei der Mutante lark die Phase des Schlüpfrhythmus beeinflusst, aber der Laufrhythmus war in Phase

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Dazu wurde ein Reportergen der Luciferase in die Körperzellen gebracht. Es wurde an einen Promotor gehängt, der durch die circadiane Uhr gesteuert ist. Es zeigten sich circadiane Leuchtrhythmen in den einzelnen Geweben. Sie konnten auch in Gewebekulturen nachgewiesen werden. Durch Lichtpulse konnte die Phase dieser Rhythmen verschoben werden (Plautz et al. (1997)).

und Periode normal. Das würde gegen eine Uhr sprechen und für ein Multioszillatorsystem.

Mutanten von Drosophila melanogaster, denen PER fehlt, deren lokomotorischen Aktivität daher nicht circadian kontrolliert wird, reagieren noch photoperiodisch.<sup>3</sup> Bei der photoperiodischen Zeitmessung ist eine circadiane Uhr beteiligt (Saunders et al. (1989)). Das heißt also, dass eine andere circadiane Uhr die photoperiodische Zeitmessung durchführt.

Selbst die Laufaktivität kann durch mehr als einen Oszillator circadian gesteuert werden. Unter Konstantbedingungen und Mutanten der optischen Lappen erkennt man im Aktogramm zwei circadiane Komponenten, die sich in ihrer Periodenlänge etwas voneinander unterscheiden und deshalb langsam auseinander driften, bis sie sich nach einiger Zeit wieder treffen (Abbildung 14.10, Helfrich (1986), Helfrich-Förster (2001a)). Eine dieser Komponenten ist der Morgenoszillator. Selbst dieser scheint aus zwei Komponenten zu bestehen. Das zeigt sich in Aktogrammen von Tieren, deren Laufaktivität unter extremeren Licht-Dunkel-Zyklen registriert wurde (Rieger (2002)).

Wir schließen daraus: Drosophila besitzt, wie andere Insekten auch, ein Multioszillatorsystem. Es kontrolliert verschiedene Vorgänge auf verschiedenen Ebenen circadian. Dieses System besteht aus autonomen Uhren in Zellen, Geweben und Organen, die direkt durch Licht-Dunkel-Zyklen synchronisiert werden, aber auch aus zentralen Schrittmacherzellen im Gehirn, die durch verschiedene Photorezeptoren, aber auch direkt durch Licht synchronisiert werden (siehe Unterabschnitt 14.2.4). Wie diese verschiedenen Komponenten des circadianen Systems zusammenwirken, ist noch nicht gut bekannt.



Abbildung 14.10: Aktogramm einer Drosophila Fliege mit zwei circadianen Komponenten im Muster der lokomotorischen Aktivität. In den ersten sieben Tagen wurde die Fliege in einem 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel gehalten. Die lokomotorischen Aktivität besteht aus einem Morgen- und einem Abendteil und die Aktivität ist mit dem externen 24 Stunden-Rhythmus synchronisiert. Vom achten Tag an war die Fliege im Dauerdunkel. Die Aktivität zeigt Freilauf mit zwei Komponenten: Die Periode der kürzeren Komponente ist etwa 22 Stunden, die Periode der längeren 25 Stunden. Deshalb laufen die beiden Komponenten langsam auseinander und treffen sich wieder. Aus Helfrich-Förster et al. (2000).252/dissociationactogram-dros

 $<sup>^{3}\</sup>mathrm{die}$  kritische Tageslänge ist allerdings um 2 Stunden kürzer



Abbildung 14.11: Lage der Photorezeptoren im Gehirn von Drosophila melanogaster zur Synchronisation des circadianen lokomotorischen Aktivitätsrhythmus. Frontalschnitt durch den Kopf mit Zentralgehirn, optischen Lappen mit Lamina, Medulla einschließlich Lobula (nicht separat gezeigt), verschiedene Photorezeptoren und neurosekretorische Zellen. Licht synchronisiert den Rhythmus (große rote Pfeile) über die Komplexaugen, die Hofbauer-Buchner (H-B) Äuglein, und die ventralen lateralen Neuronen (sLNv, rot-braun, und lLNv, lila) und können den Rhythmus (kleine rote Pfeile) über Ozellen und die dorsalen lateralen Neuronen beeinflussen (LNd). Nach Helfrich-Förster et al. (2000). 252C/ dros-pr

## 14.2.3 Lokalisation der Uhren, die Schlüpfen und Laufaktivität kontrollieren

Die Zentren der circadianen Kontrolle des Schlüpfens und der lokomotorischen werden im Hinblick auf ihre Lokalisation, Hierarchie, Kopplung und neuronale Verbindungen mit Eingängen und Ausgängen intensiv untersucht (Ubersicht: Helfrich-Förster (2001b), Helfrich-Förster et al. (1998), Kaneko (1998)). Die Neuroarchitektur dieses Systems ist in Abbildung 14.11 dargestellt. Es zeigt auch die verschiedenen Photorezeptoren für Licht, welches die Uhr-Zellen synchronisiert (sie werden im nächsten Unterunterabschnitt 14.2.4 diskutiert). Die Schrittmacher-Neuronen für Schlüpfen und Aktivität sind im Lateralgehirn lokalisiert und werden deshalb Lateral-Neuronen (LN) genannt. Die LN bestehen aus einer mehr dorsal liegenden Gruppe (LNd, 5 bis 8 Zellen) und aus einer mehr ventral gelegenen (LNv). Die ventrale Gruppe besteht aus Neuronen mit großen Somata (große LNv, 4 bis 6 Zellen) und aus Neuronen mit kleinen Somata (kleine LNv, 5 Zellen). Die kleinen LNv senden Projektionen in den dorsalen Teil des zentralen Gehirns. Die kleinen LNv sind die wichtigsten Zellen für das circadiane Verhalten. Drei Gruppen dorsaler Neuronen (DN1, etwa 15 Zellen, zwei DN2 Zellen, und etwa 40 ziemlich kleine DN3 Zellen) liegen im dorsalen oberen Gehirn. Im larvalen Gehirn findet man mit Hilfe von Antisera gegen Uhrproteine PER und TIM nur kleine LNv, DN2 und zwei Zellen der DN1.

Die neuronalen Verbindungen wurden durch immuno-Färbung eines Neuropeptids, des Pigment dispersing Faktors PDF, und mit *per-* oder *tim*getriebenem GAL4 in transgenen Fliegen (die Markergene wie lacZ oder Sequenzen für grün fluoreszierendes Protein (GFP) oder TAU Protein enthalten) nachgewiesen. Die *per/tim* exprimierenden lateralen Neuronen projizieren hauptsächlich ins dorsale Protocerebrum, wo ihre Enden überlappen. Von den DN Gruppen projizieren nur die DN1 zu anderen Gehirngebieten wie die akzessorische Medulla aMe und vielleicht zum optischen Lappen. Andere DN1 Zellen projizieren zum Ösophagus. Die Hauptprojektionen der DN1 laufen als dorsale Kommissuren zur contralateralen Seite des dorsalen Gehirns. Die DN2 Neuronen laufen in der gleichen Kommissur, aber die DN2 Somata enthalten kein Uhr-Protein. Die DN3 Zellen laufen mehr ventral und scheinen im ipsilateralen dorsalen Gehirn zu enden. Hier überlappen sie mit einigen Fasern vom LNd und den DN2 Terminals. Die LNd Axone laufen entlang der äußeren Oberfläche des Lateralhorn-Neuropils und bilden einen dorsalen Ast, der parallel zu den DN3 Fasern verläuft, und einen ventralen Ast, der die Mittellinie unter der DN1/DN2 Kommissur kreuzt.

Die Hauptprojektionen der Uhr-Zellen enden im oberen Protocerebrum. Dieser Teil des Gehirns hat Verbindungen zu den meisten Stellen des Gehirns und enthält außerdem neurosekretorische Zellen. Circadiane Signale von den Uhr-Zellen können so über elektrische oder hormonelle Wege an Zielorgane gelangen. Alle Uhr-Zellen Neuronen scheinen miteinander verbunden zu sein und sind somit in der Lage, circadiane Zeit an das dorsale Protocerebrum und vielleicht über die großen LN auch in die optischen Lappen zu schicken. Aber die verschiedenen Zellen können verschiedenen Rollen im circadianen System spielen.

Die kleinen LNv und LNd sind die Gruppen, die am wahrscheinlichsten die Schrittmacher für circadiane Verhaltensrhythmen repräsentieren. Sie sind ausreichend und essentiell für Schlüpfen und lokomotorische Aktivität, wie eingehend von Helfrich-Förster (2001b) diskutiert. Sogar eine einzelne funktionelle LN genügt, wie an *disco* Mutanten gezeigt, bei denen gelegentlich eine oder wenige dieser Zellen gefunden werden (Helfrich-Förster (1998)). Die DN sind aber auch am circadianen System beteiligt. Für circadianes Schlüpfen sind die kleinen LNv die relevanten Schrittmacher-Zellen. Nur sie exprimieren *per* und *tim* dauernd. In der adulten Fliege sind die LNd, die großen LNv und die kleinen LNv an der Kontrolle der circadianen lokomotorischen Aktivität beteiligt. Diese Gruppen verwenden PDF als Neurotransmitter für abwärts gelegene Neuronen.

Mutanten ohne PDF werden arrhythmisch nach Übertragen aus einem 12:12 stündigen LD Zyklus in konstante Bedingungen. Das gleiche gilt für transgene Fliegen, in welchen die großen LNv und die kleinen LNv durch spezifische Zelltod-Gene ausgeschaltet wurden. Aber in beiden Fällen kann für etwa eine Woche ein gedämpfter Rhythmus mit einer kurzen Periode beobachtet werden. disco Mutanten ohne LNv und ohne LNd sind bereits nach 1 bis 3 Tagen arrhythmisch. Die LNd sind also neben den LNv am Zustandekommen des Aktivitätsrhythmus beteiligt. Die großen LNv projizieren nicht ins dorsale Protocerebrum und haben vielleicht eine spezielle Funktion beim Koppeln der kleinen LNv und LNd der beiden Hemisphären. Sie sind für das rhythmische Verhalten vielleicht nicht relevant. Details und ausführliche Diskussion bei Helfrich-Förster (2001b).

# 14.2.4 Photorezeptoren für die Synchronisation der Laufuhr und Stellen des molekularen Rückkopplungsoszillators

Circadiane Rhythmen haben bestimmte Eigenschaften wie Freilauf und Temperaturkompensation. Sie lassen sich durch Zeitgeber synchronisieren, wobei der Licht-Dunkel-Wechsel der wichtigste ist. Das Licht wird von Photorezeptoren wahrgenommen und in Signale umgewandelt, die zum Oszillator gelangen und ihn beeinflussen. Wir hatten bereits bei der Schlüpfuhr einiges über die Photorezeptoren erfahren, über die Licht das Schlüpfen synchronisiert (siehe Unterabschnitt 14.1.4).

Wie Licht den lokomotorischen Aktivitätsrhythmus von Drosophila synchronisiert, ist in Abbildung 14.11 schematisch dargestellt. Es ist nicht nur eine Art von Photorezeptor beteiligt, sondern mehrere. Auch wenn ein oder mehrere dieser Rezeptoren fehlen (in Augenmutanten), wird der Rhythmus noch synchronisiert (Helfrich and Engelmann (1983), Helfrich (1986), Dushay et al. (1989), Wheeler et al. (1993)). Alle Photorezeptoren müssen fehlen oder ihre Funktion verloren haben, wenn die Fliegen nicht mehr durch einen Licht-Dunkel Zyklus synchronisiert werden können (Helfrich-Förster et al. (2001)). Einzelheiten werden im folgenden diskutiert.

Komplexaugen tragen zur circadianen Photorezeption bei. Obwohl die lokomotorische Aktivität von Mutanten ohne Komplexaugen (oder Tieren mit Carotinoid-Mangel) noch durch Licht-Dunkel Zyklen synchronisierbar sind, unterscheidet sich ihr Aktionsspektrum von dem des Wildtyps (Blaschke et al. (1996), Ohata et al. (1998)).

Das Aktionsspektrum für augenlose Fliegen ähnelt dem für Phasenverzögerungen des Schlüpfrhythmus. Der Hauptunterschied liegt in der Empfindlichkeit gegenüber rotem Licht. Schlüpfrhythmus und Rhythmus der Laufaktivität blinder Mutanten sind für rot unempfindlich (Helfrich-Förster (1997)). Das lässt vermuten, dass Rhodopsin zur Synchronisation des Aktivitätsrhythmus beiträgt, aber nicht zur Phasenverschiebung des Schlüpfens. Synchronisation benutzt tonische und phasische Wirkungen des Lichtes<sup>4</sup>. Phasenverschiebungen durch kurze Lichtpulse scheinen durch nichtparametrische Effekte des Lichtes hervorgebracht zu werden. Die Komplexaugen und die larvalen Photorezeptoren, die beide Rhodopsin als Photopigmente benutzen, sind vielleicht für die para-

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Tonische Wirkungen des Lichtes werden auch 'parametrische Effekte´ genannt und beziehen sich auf lang anhaltende Belichtung. Phasische Wirkungen des Lichtes werden auch 'nicht-parametrische Effekte´ genannt und werden durch Lichtpulse hervorgerufen. Man sollte aber, 'parametrisch´ und 'nicht-parametrisch´ auf den Mechanismus des Lichtes beschränken: Parametrische Effekte modifizieren interne Parameter, die das oszillierende System definieren, und nicht-parametrische Effekte ändern den Zustand des Systems.

metrischen Effekte des Lichtes verantwortlich. Für den Aktivitätsrhythmus gibt es eine spektrale Responskurve<sup>5</sup> für Phasenverschiebungen (Suri et al. (1998)). Es besitzt ein Maximum bei 500 nm mit einiger Empfindlichkeit für rotes Licht. Es ähnelt also mehr dem Aktionsspektrum der Synchronisation der Aktivität als dem der Phasenverschiebung des Schlüpfens. Das lässt vermuten, dass auch die Komplexaugen zur Phasenverschiebung des Aktivitätsrhythmus beitragen (nicht-parametrischer Effekt des Lichtes), und dass Unterschiede in der Zusammensetzung circadianer Photorezeptoren der Larven und der Adulttiere für die verschiedenen Aktionsspektren des Schlüpfens und der Aktivität der Adulttiere verantwortlich sind.

Die circadiane Lichtempfindlichkeit von Fliegen wird bei Carotinoid-Mangel um 3 Größenordnungen reduziert. Das entspricht der Abnahme der visuellen Empfindlichkeit der Komplexaugen bei Carotinoid-verarmten Fliegen. Bei der Mutante sine oculis ohne Komplexaugen war die circadiane Lichtempfindlichkeit etwa 2 Größenordnungen geringer als bei Wildtyp-Fliegen.

Die **Ozellen** scheinen bei der Synchronisation durch extreme Licht-Dunkel-Zyklen zusammen mit den Komplexaugen eine Rolle zu spielen.

Es sind aber noch weitere Photorezeptoren bei der Synchronisation des lokomotorischen Aktivitätsrhythmus beteiligt<sup>6</sup>. Eins dieser extraretinalen Photorezeptoren sind die **Hofbauer-Buchner Äuglein**, die ebenfalls zur Synchronisation der Aktivitätsrhythmen von Fliegen beitragen (Hofbauer and Buchner (1989)).

Die Hofbauer-Buchner Äuglein bestehen aus vier Photorezeptorzellen mit zahlreichen Microvilli in Rhabdomeren (Yasuyama and Meinertzhagen (1999). Die Rhabdomeren zeigen Rhodopsin (Rh6)artige Immunoreaktivität und reagieren mit Antisera gegen Arrestin und gegen Period-Protein PER (Hall (1998)). Arrestin wird für die Licht-Transduktionskaskade gebraucht (Van Swinderen and Hall (1995)). Als Neurotransmitter werden Histamine (Pollock und Hofbauer 1991) und Acetylcholin (Yasuyama and Meinertzhagen (1999)) verwendet. Die Äuglein projizieren in die Gehirnregion, wo sich die circadianen Schrittmacher-Zellen befinden (Helfrich-Förster (1996), Kaneko (1998), Yasuyama and Meinertzhagen (1999)). Damit erfüllen sie die anatomischen Kriterien für circadiane Photorezeptoren. Analoge Strukturen wurden auch bei anderen Diptera, bei Mecoptera, Trichoptera und Coleoptera gefunden (Übersicht: Yasuvama and Meinertzhagen (1999)), aber ihre physiologische Bedeutung für circadiane Synchronisation ist noch nicht bewiesen.

Die Hofbauer-Buchner Äuglein sind jedoch nicht die einzigen extraretinalen circadianen Photorezeptoren, da bei Augen-losen Fliegen die Dosis-Responskurven für verschiedene Wellenlängen sich in ihrer Steigung unterscheiden. Sogar die glass Mutanten, die keinerlei interne und externe Augenstrukturen mehr besitzen, können noch synchronisiert und ihr Rhythmus verschoben werden (Helfrich-Förster (1997), Hall (1998)). Es wurde schließlich gezeigt, dass die circadianen **Schrittmacher-Zellen** (LNv) selbst Licht-empfindlich sind und das Cryptochrom als Licht-absorbierendes Molekül benutzt wird (Emery et al. (2000), Ceriani et al. (1999)).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Drosophila multiple Photorezeptoren zur Synchronisation benutzt. Larven und Adulttiere benutzen das Blaulicht-empfindliche Cryp-

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Im Gegensatz zu einem Aktionsspektrum zeigt eine spektrale Responskurve die Reaktion auf die gleiche Menge verschiedenfarbigen Lichtes. In einem Aktionsspektrum wird die Zahl der Lichtquanten bestimmt, die zur gleichen Reaktion (zum Beispiel Phasenverschiebung) führen

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>So fanden Blaschke et al. (1996) zwei Maxima im Aktionsspektrum der Synchronisation des Aktivitätrhythmus von Wildtyp und Augenlosen Fliegen. Außerdem sind die Geraden, die den Prozentsatz synchronisierter Fliegen als Funktion der Lichtintensität in Dosis- Responskurve darstellen, für mehrere der getesteten Wellenlängen nicht parallel zueinander. Interessanterweise waren diese Kurven auch bei Augenlosen Fliegen nicht parallel, was vermuten lässt, dass sogar Augen-lose Fliegen verschiedene Photorezeptoren zur Synchronisation benutzen.

tochrom als Pigment in den Schrittmacher-Neuronen. Extraretinale (Hofbauer-Buchner-Äuglein) und retinale Augen (Komplexaugen und Ozellen) spielen zusätzlich eine Rolle, um die Aktivität an die Änderungen der Lichtintensität anzupassen.

Warum werden multiple Photorezeptoren benutzt? Dadurch könnte das circadiane System in der Lage sein, die unterschiedlichen Qualitäten des natürlichen Lichtes wahrzunehmen. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird reduziert, wenn mehrere Eingänge benutzt werden. Natürliche Licht-Dunkel Zyklen bestehen nicht nur aus weißem Licht-an und Licht-aus, sondern aus allmählich sich ändernden Lichtintensitäten während des Zwielichtes. Bünning (1936) schlug vor, dass Organismen niedrige Lichtintensitäten des Zwielichtes für die Tageslängenmessung verwenden: Sie sind verlässliche Referenzpunkte der Jahreszeiten. Während des natürlichen Zwielichtes am Morgen und Abend ändert sich das Licht in Menge, spektraler Zusammensetzung und in der Lage der Sonne in Bezug auf den Horizont. Organismen könnten diese Eigenschaften benutzen, um je nach ihrer Ökologie und Strategie Licht zu sammeln (siehe Roenneberg and Foster (1997)). Synchronisation durch Morgen- und Abenddämmerung ist wirksamer als Licht-an und Licht-aus Programme bei allen bisher getesteten Tieren einschließlich dem Menschen (Fleissner and Fleissner (2001a)).

Ferner scheinen die verschiedenen Photorezeptoren eine unterschiedliche Bedeutung für die Synchronisation des circadianen Rhythmus und für direkte Lichteffekte zu haben (Emery et al. (2000), Helfrich-Förster et al. (2001), Rieger (2002)). Die Komplexaugen bewirken einen direkten Lichteffekt beim Aktivitätsmuster der Adulttiere und synchronisieren den circadianen Rhythmus besonders in extremen Lang- und Kurztagen. Auch die Ozellen scheinen diese Effekte zu zeigen. Möglicherweise wirken sie dabei auf den Rhythmus, der für den Morgengipfel 2 verantwortlich ist (siehe Seite 322), während die Komplexaugen den für den Morgengipfel 1 verantwortlichen Rhythmus synchronisieren (Rieger (2002)). Cryptochrom wirkt als zelluläres Photorezeptor-Molekül auf circadiane Rhythmen, ist aber zur Synchronisation des Aktivitätsrhythmus nicht zwingend nötig. Die Bedeutung der Hofbauer-Buchner-Äuglein für die Synchronisation der Aktivitätsrhythmen und direkter Lichteffekte ist noch nicht bekannt, da bisher keine Mutanten bekannt sind, denen diese Photorezeptoren fehlen oder bei denen sie defekt sind. Versuche mit Zelltod-Genen, die diese Rezeptoren spezifisch ausschalten, sind geplant und könnten diese Frage beantworten.

## 14.2.5 Molekulare Grundlagen circadianer Rhythmen von Drosophila

Welche Mechanismen liegen den circadianen Uhren im Gehirn von *Drosophila* zugrunde, die Schlüpfen und lokomotorische Aktivität kontrollieren? Das wurde in den vergangenen Jahren intensive und erfolgreich untersucht. Es gibt aber noch viele unbeantwortete Fragen. Hier werden nur die wichtigsten Mechanismen beschrieben. Einzelheiten und Diskussionen der Probleme können in neueren Übersichtsarbeiten gefunden werden Hall (2002), Edery (2000), Giebultowicz (2000), Williams and Sehgal (2001), Young and Kay (2001a)).

Beide Rhythmen - Aktivität und Schlüpfen werden durch eine molekulare Rückkopplungsschleife beschrieben. Sie wird durch Interaktion einiger *Uhr-Gene*, ihrer Produkte und ihres Abbaus hervorgerufen. Die Gene heißen period (per), timeless (tim), Clock (Clk), cycle (cyc)und doubletime (dbt) und die entsprechenden Proteine sind PER, TIM, CLK, CYC, und DBT (siehe Tabelle 14.1). Mutationen in diesen Genen beeinflussen beide Rhythmen stark, die Fliegen werden aperiodisch oder ändern ihre Periodenlänge des freilaufenden Rhythmus.

Die Rückkopplungsschleife hat die folgende Struktur (Abbildung 14.12): CLK und CYC sind basische Helix-loop Helix-PAS Transkriptionsfaktoren. Sie bilden Heterodimere und binden an ein E-box Element in den Promotoren der per und tim Gene. Dadurch wird die Transkription beider Gene aktiviert (Darlington et al. (1998), Rutila et al. (1998), Hao et al. (1997)). Die mRNA von per und tim steigt kontinuierlich an, bis am frühen Abend ein Maximum erreicht ist. Die Produkte PER und TIM erreichen ihr Maximum erst am späten Abend (Zerr et al. (1990), Edery et al. (1994)). Die Verzögerung scheint durch post-transkriptionale Regulation der per mR-NA (Chen et al. (1998)) und des PER zustande zukommen (Dembinska et al. (1997), Stanewsky et al. (1997)). Eins der regulatorischen Mechanismen destabilisiert PER durch DBT-abhängige Phosphorylierung (Kloss et al. (1998), Price et al. (1998)). PER wird aber durch Dimerisierung mit TIM stabilisiert. Wenn eine kritische Schwelle des PER-TIM Dimers erreicht ist, können sie in den Kern gelangen und dort ihre eigene Transkription hemmen, indem sie den transkriptionalen Aktivator CLK-CYC inaktivieren (Darlington et al. (1998)). Durch die Zeitverzögerung zwischen mRNA und Protein führt diese negative Rückkopplung zu einer stabilen Oszillation von per und tim mRNA und den Proteinen.

Möglicherweise gibt es sogar zwei miteinander verknüpfte negative Rückkopplungsschleifen: die *per/tim* Schleife, in der die Transkription durch CLK-CYC aktiviert und durch PER-TIM gehemmt wird, und eine Clk Schleife, in der die Transkription durch CLK-CYC unterdrückt und durch PER-TIM de-reprimiert wird (Glossop et al. (1999)).

Nicht alle Komponenten scheinen bisher entdeckt worden zu sein. Kürzlich berichteten Belvin et al. (1999), dass das cAMP Respons-Element Bindeprotein (CREB) ebenfalls an der Rückkopplungsschleife beteiligt ist. Es fördert die Oszillationen von PER und TIM. Weitere solcher Uhr-Faktoren werden möglicherweise noch entdeckt.

### 14.2.6 Molekulare Grundlage der Synchronisation

Um die circadian Photorezeption in den LNv zu verstehen, mussten wir zunächst wissen, wie circadiane Rhythmen auf der molekularen Ebene dieser und anderer Zellen von Drosophila entstehen. Wenn der gerade beschriebene Rückkopplungskreis Grundlage der Rhythmen ist, muss er durch Licht-Dunkel Zyklen synchronisiert, durch Lichtpulse Phasenverschoben und durch Dauerlicht angehalten werden. Das wird durch Licht-abhängigen Abbau von TIM erreicht; andere Uhr-Proteine werden durch Licht nicht abgebaut (Hunter-Ensor et al. (1996), Lee et al. (1996)). Unter Dauerlicht ist wenig TIM vorhanden. Da PER mit TIM dimerisieren muss, um vor Abbau geschützt zu sein, ist auch wenig PER vorhanden (Price et al. (1995)). per und tim mRNA haben eine durchschnittliche Konzentration. ähnlich wie es bei den  $per^0$  und  $tim^0$  Mutanten der Fall ist (Qiu and Hardin (1996)). Aus diesem Grunde oszillieren die Uhrgene und Proteine im Dauerlicht nicht. Das würde erklären, warum im Dauerlicht Arrhythmie gefunden wird.

Wird der Abbau von TIM in den LN nach kurzen Lichtpulsen gemessen, korreliert er gut mit der Größe der Phasenverschiebung des Aktivitätsrhythmus (Young (1998)). Die spektralen Responskurven für TIM Abbau und die Phasenverschiebungen in den Verhaltensrhythmen zeigen maximale Reaktionen auf Licht von 400 bis 450 nm. Somit scheinen beide Ereignisse miteinander kausal verbunden zu sein. Fehlt PER, wird TIM trotzdem abgebaut, also auch bei nicht funktionierender circadianer Uhr (Suri et al. (1998)). Es bedarf auch keiner funktionieren-



Abbildung 14.12: Molekulares Modell der Drosophila Uhr: Die Uhr-Gene per und tim exprimieren PER (blau) und TIM (grün) Uhr-Proteine. Sie werden im Cytoplasma phosphoryliert (hellere Farben) und bilden ein Dimer. Dieses kann die Kernmembran passieren. Durch stärkere Phosphorylierung hemmt es (graue Pfeile) die Transkriptionsfaktoren dCLK und CYC (rötlich). Damit wird die Transkription von PER und TIM gestoppt. Das vorhandene PER und TIM nimmt ab, weil die phosphorylierten Proteine abgebaut werden (grau). Licht (rot, Pfeil, oben) wird über Photorezeptoren perzipiert und ändert nach noch unbekannten Schritten das Drosophila Cryptochrom DCRY. Dadurch wird das PER/TIM Dimer abgebaut. Nach A36 (n.d.). E252E/drosmolmod

den Komplexaugen (Yang et al. (1998)). Das zeigt, dass die circadian Beeinflussung durch Licht über TIM über einen extraretinalen Weg läuft, wie bereits durch Verhaltensstudien bekannt war.

Alle diese Ergebnisse zeigen, dass der Abbau von TIM für die circadiane Lichtperzeption entscheidend ist.

Nicht immer wird TIM nach Lichtbeginn abgebaut. Zum Beispiel schwankt TIM im Larvenstadium in den so genannten Dorsal Neuronen (DN) in Gegenphase zu LN (hoch während des Tages, niedrig während der Nacht Kaneko et al. (1997)). Die biologische Bedeutung ist unklar. Aber es zeigt, dass TIM unterschiedlich reguliert werden kann und nicht direkt Licht-empfindlich ist. Irgendwie muss das Lichtsignal biochemisch von Blaulicht absorbierenden Pigmenten auf TIM übertragen werden.

Das Blaulicht absorbierende Pigment Drosophila-Cryptochrom (DCRY) ist an der Lichtübertragung auf TIM beteiligt (Emery et al. (1998), Stanewsky et al. (1998)). Cryptochrome sind Flavoproteine (Übersicht: Cashmore et al. (1999)). Das Absorptionsspektrum von Cryptochrom entspricht den Aktionsspektren der Verhaltensrhythmen von Drosophila (Selby and Sancar (1999)).

Die DCry Gentranskription wird durch die circadiane Uhr kontrolliert, aber das Protein DCRY wird unabhängig von den Uhr-Molekülen durch Licht beeinflusst (Egan et al. (1999), Emery et al. (1998)).

DCRY spielt also eine wichtige Rolle bei der circadianen Lichtperzeption. Offenbar ist TIM ein direktes Ziel von DCRY. Tatsächlich wurde vor kurzem gezeigt, dass DCRY seine photochemische Konformation nach Belichtung ändert: DCRY kann jetzt in den Kern gelangen und dort mit dem PER/TIM Komplex interagieren (Ceriani et al. (1999)). Dadurch wird der PER/TIM Komplex inaktiviert und nimmt nicht mehr an der negativen Rückkopplungsschleife teil. Der Abbau von TIM ist nicht der erste Schritt bei der circadianen Lichttransduktion, sondern Folge der Blockierung von PER/TIM durch DCRY. Das würde auch die Überempfindlichkeit der  $per^s$  Mutante auf Licht erklären (Konopka (1979), Saunders et al. (1994), Hall (1998), Suri et al. (1998)).

DCry wird in den LNv exprimiert, den circadianen Schrittmacherzellen (Egan et al. (1999)). Das gilt auch für die *Drosophila* Larven. Die kleinen LNv sind schon vom ersten Larvenstadium an vorhanden und ihr PER und TIM schwanken circadian (Kaneko et al. (1997)). Die kleinen LNv der Larven werden durch Cryptochrom *und* die larvalen Augen synchronisiert (Stanewsky et al. (1998), Helfrich-Förster and Engelmann (2001)). Fehlen beide Photorezeptoren, lassen sie sich nicht mehr synchronisieren. Es ist noch nicht bekannt, ob das auch für den Schlüpfrhythmus gilt.

## 14.2.7 Molekulare Grundlage der Temperaturkompensation

Temperaturkompensation circadianer Rhythmen wurde bereits mehrfach erwähnt (siehe die Beispiele in Abbildung 4.6, 6.12) und verschiedene Modelle wurden vorgeschlagen, sie zu erklären (siehe zum Beispiel Abbildung 5.6 oder Abschnitt 16.4, Übersicht Ruoff et al. (2000b)).

Bei Drosophila sind Mutanten bekannt, die die Temperaturkompensation betreffen. Steigende Temperatur verlängert zum Beispiel die Periode der Verhaltensrhythmen von  $per^{L}$  (Konopka et al. (1989), Rothenfluh et al. (2000)). Da normalerweise chemische Reaktionen durch steigende Temperaturen beschleunigt werden und das auch bei vielen ultradianen Rhythmen der Fall ist, scheint diese 'Überkompensation' etwas besonderes zu sein. Da die Periode mit fallender PER Konzentration abnimmt, könnte man annehmen, dass diese Mutante weniger PER besitzt. Bei anderen per Mutanten wie per<sup>s</sup> läuft jedoch die Uhr bei höherer Temperatur schneller. Es ist also wahrscheinlicher,
dass der Mechanismus der Temperaturkompensation defekt ist. Die molekularen Gründe sind noch unbekannt (siehe Diskussion von Hall (2002)).

Ein Gebiet in der Mitte von PER könnte für die Temperaturkompensation verantwortlich sein. Eine PAS/C Verbindung könnte zum Beispiele mit einer PAS/PAS Verbindung kompetieren. Die Verstärkung von PAS/PAS durch höhere Temperatur könnte durch PAS/C Effekte blockiert werden und dadurch zu einer Temperaturunempfindlichkeit der Periodenlänge führen (Guantieri et al. (1999)). Es könnten aber auch andere Stellen des PER Proteins verantwortlich sein, zum Beispiel eine oberhalb des TG repeat, aber unterhalb der C-Domäne (Peixoto et al. (1998)). Auch andere Teile des Uhrmechanismus wie zum Beispiel *tim* könnten beteiligt sein.

Wie die Temperaturkompensation der circadianen Rhythmen von Drosophila zustande kommt, wurde auch mit Modellen beschrieben (Leloup and Goldbeter (1997)). Ruoff and Rensing (1996) erweiterten das Oszillatormodell von Goodwin, indem sie eine monomere und eine oligomere Form des PER Proteins einführten. Das Gleichgewicht zwischen den beiden Formen hängt von der Temperatur ab. In der  $per^{L}$  Mutante verschiebt steigende Temperatur das Gleichgewicht zur monomeren Form und beide Formen werden langsamer abgebaut als bei  $per^+$ . Bei  $per^S$  Mutanten ist das Gleichgewicht unbeeinflusst, aber PER<sup>S</sup> wird schneller abgebaut (Ruoff et al. (1997), siehe Abbildung 16.21). Im Modell wird der Temperatureinfluss über Uhrprotein-Abbau kontrolliert.

## 14.3 Rhythmen und Lebensdauer

Die Lebensdauer von *Drosophila melanogaster*-Fliegen wird verkürzt, wenn die Tiere in Kunsttagen gehalten werden, deren Periode kürzer oder länger als 24-Stunden sind (Pittendrigh and Minis (1972)) (Abbildung 14.14).



Abbildung 14.13: Temperaturkompensation des Laufaktivitätsrhythmus von *Drosophila* kann mit dem Goodwin-Oszillator erklärt werden (Abbildung 16.14). Die Temperaturabhängigkeit der *Drosophila* Mutanten per<sup>L</sup> (grün) und per<sup>S</sup> (blau) werden erfolgreich vorausgesagt (Kreise sind Voraussagen, Dreiecke experimentelle Befunde) und die Temperaturkompensation des Wildtyps beziehungsweise von per<sup>+</sup> ist vorhanden. Nach Ruoff et al. (1997). D252F/tcomp-dros-modell



Abbildung 14.14: Lebensdauer von *Drosophila* unter nicht-24-Stunden-Zyklen. Nach Pittendrigh and Minis (1972). D249/lebensdauerdroso.

Bei anderen Fliegen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt: Aschoff et al. (1971) hielten Phormia terrae novae- Fliegen in einem 12:12stündigen Licht-Dunkel-Wechsel. Eine Gruppe wurde jede Woche um sechs Stunden verzögert, als ob sie von Europa nach USA geflogen worden wären. Bei einer anderen Gruppe wurde der Rhythmus um sechs Stunden vor-verschoben (als ob sie von USA nach Europa geflogen worden wären). Bei einer dritten Gruppe wurde in einer Woche der Rhythmus verzögert, in der nächsten verfrüht, danach wieder verzögert. Im Vergleich zu den Tieren, die immer im gleichen Rhythmus blieben, war die Lebensdauer der Tiere in den drei Gruppen verkürzt (Abbildung 14.15).



Abbildung 14.15: Lebensdauer von Phormia terrae novae Fliegen nach Verschiebung des Licht-Dunkel-Zyklus um 6 Stunden nach früheren oder späteren Zeiten. Nach Aschoff et al. (1971). E250n/lebensdauer-phormia

In einem anderen Experiment wurden Musca domestica-Fliegen nach dem Schlüpfen in schwachem Rotlicht gehalten und ihre lokomotorische Aktivität gemessen. Sie zeigten für einige Zeit einen circadianen Rhythmus, aber die meisten Tiere wurden nach einiger Zeit arrhythmisch. Es zeigte sich, dass die Tiere am längsten lebten, die am Ende noch rhythmisch waren (Abbildung 14.16). Das könnte bedeuten, dass ein stabiler circadianer Rhythmus für ältere Fliegen von Bedeutung für ihre Langlebigkeit sein könnte.



Abbildung 14.16: Prozentsatz von Fliegen mit circadianem Rhythmus unter konstanter Temperatur im schwachen Rotlicht (Engelmann, unveröffentlicht). E251/lebensdauer-musca

Wir prüften auch, ob die Lebensdauer von Drosophila-Fliegen verkürzt wird, wenn ihr circadianer Rhythmus durch eine besondere Behandlung zum Erliegen gebracht wird. Diese Behandlung wird in dem Spezialthema 'Arrhythmie' erklärt. Es zeigten sich aber keine Unterschiede in der Lebensdauer (Mack and Engelmann (1982)). Es gibt aber eine Reihe von Einwänden gegen diese Interpretation. So wurde die Arrhythmie im Puppenstadium induziert. Die Tiere schlüpften nicht mehr circadian, sondern gleichmäßig über den Tag verteilt. Es könnte aber sein, dass die gestoppte Uhr durch das Schlüpfen oder durch andere Er١

eignisse wieder in Gang kommt. Es könnte auch sein, dass zwar die Uhr, die das Schlüpfen kontrolliert, arrhythmisch wurde, die Uhr, die das Laufen circadian steuert, aber nicht.

Weitere Experimente wären nötig, um diese interessante Frage zu klären, ob die Lebensdauer verkürzt wird, wenn der circadiane Rhythmus unterbunden wird.

## 14.4 Wie wird Schlüpfen und Laufen der Fliegen registriert?

#### 14.4.1 Schlüpfrhythmus messen

Der Schlüpfrhythmus von Drosophila (und anderer Insekten) aus dem Puparium kann nur an einer Population festgestellt werden. Früher wurden dazu Schüttelapparaturen (Bang boxes) verwendet (ref). Die Puppen wurden an Platten festgeklebt. Stündlich wurden die Platten mechanisch gehoben und fallen gelassen, sodass die geschlüpften Fliegen durch einen flachen Trichter herunter fielen. Wasser gefüllte Gefäße wurden auf einer Dreheinrichtung unter die Trichter gebracht. Die Zahl der im Wasser ertrunkenen Fliegen konnte dann täglich bestimmt werden.

Später wurde diese aufwendige und störanfällige Methode durch Lichtschranken unter den Trichter-Enden ersetzt (ref). Die Methode funktionierte nur im Dunkeln oder im Rotlicht und nur mit glattwandigen Trichtern (aus Teflon oder teflonisiertem Glas), weil die geschlüpften Tiere im Licht nicht unmittelbar nach dem Schlüpfen herunterfallen (Abbildung 14.17).

Bei einer anderen Methode werden die Puppen in Löcher einer Platte gebracht, auf deren Unterseite ein Netz verhindert, dass die Puppen herausfallen. Über der Platte liegt eine berußte



Abbildung 14.17: [Registrieren des Schlüpfrhythmus von *Drosophila*-Fliegen] Registrieren des Schlüpfrhythmus von *Drosophila*-Fliegen aus dem Puparium mit teflonisierten Trichtern und Infrarot-Lichtschranken am Ende des Trichters (linkes Bild). 258/registrieren-dros

Glasplatte. Beim Schlüpfen versuchen die Tiere sich zu befreien und kratzen den Ruß ab, sterben aber schnell ab und vertrocknen. Rotlicht kann von unten durch die vom Ruß freigekratzten Stellen auf Photozellen fallen. Die Spannung der Photozellen ist dann ein Maß für die Zahl der geschlüpften Tiere (Engelmann (1999) unter http://bioclox.bot.biologie.unituebingen.de/). Statt einer Photozelle kann man auch eine Videokamera über den Platten anbringen und mit einem Bildanalyseprogramm die Zahl der geschlüpften Tiere indirekt bestimmen.

#### 14.4.2 Laufrhythmus messen:

Um die lokomotorische Aktivität von Drosophila zu registrieren, werden einzelne Fliegen in kleinen Gefäßen wie zum Beispiel Spektralphotometer-Küvetten gehalten. kleines Stückchen Hagelzucker Ein und der Docht einer Wasserflasche genügen, um die Tiere einige Wochen am Leben zu halten. Die Laufaktivität wird mit einer Infrarot-Lichtschranke gemessen (Engelmann (1999) unter http://bioclox.bot.biologie.unituebingen.de/). Läuft die Fliege durch die Lichtschranke, wird ein elektrisches Signal erzeugt und gespeichert (ref). Aus den Daten lassen sich Aktogramme erzeugen (Abbildung 14.9). Oft reduziert man dabei die Information. Man bestimmt also nicht, wie oft ein Tier in einem bestimmten Zeitraum die Lichtschranke unterbrochen hat. Stattdessen stellt man fest, ob ein Tier in einem bestimmten Zeitintervall (beispielsweise in 4 Minuten) mindestens einmal (oder mindestens n mal) aktiv war. Dann wird aus dem Histogramm ein Strich-Aktogramm (Abbildung 14.9).

Besonders vielseitig lassen sich Bildanalyseverfahren einsetzen. Mit einer Videokamera wird das Verhalten des Insekts registriert und die Bilder mit Bildanalyseprogrammen ausgewertet. Hier lassen sich sehr viel mehr Informationen auswerten als bei dem vorher geschilderten Verfahren mit Lichtschranken. So kann festgestellt werden, an welchen Stellen des Käfigs sich das Tier befindet, ob es frisst oder trinkt (Abbildung 14.18).

## 14.5 Genetische und molekularbiologische Methoden zum Aufklären von Rhythmen

#### 14.5.1 Entdeckung und erste Untersuchungen

1971 wurden von Konopka und Benzer drei Mutanten von *Drosophila melanogaster* erzeugt und isoliert, die zu ungewöhnlichen Zeiten schlüpften. Es zeigte sich, dass bei einer der Mutanten der Schlüpfrhythmus kürzer als beim Wildtyp war. Bei der zweiten Mutante war der Schlüpfrhythmus verlängert. Die dritte Mutante zeigte kein rhythmisches Schlüpfen. Auch die rhythmische Steuerung der Laufaktivität war entsprechend verändert (Abbildung 14.19). Die

not found!

Abbildung 14.19: Schlüpfrhythmen und Aktogramme der Mutanten  $per^s$ ,  $per^l$  und  $per^0$  von Drosophila melanogaster. 253/per-mutantendros

Mutation eines Gens auf dem x-Chromosom zwischen zeste und white im Abschnitt 3 Bxx Epskil/261.eps not found!

Abbildung 14.18: Das Verhalten von einzelnen *Drosophila*-Fliegen kann mit einer Video-Kamera registriert und mit einem Rechner ausgewertet werden. Die (Spektralphotometer-) Küvetten enthalten je eine Fliege, ein kleines Stück Zucker (als Futter) und einen Docht zu einem Wasserbehälter (zum Trinken). Außerdem haben die Küvetten eine seitliche Öffnung mit Netz zur Belüftung. Licht roter Leuchtstoffröhren (die zusätzlich noch mit einer roten Folie umwickelt sind) beleuchtet die Tiere von der Seite, sodass sie mit der Video-Kamera erkannt werden. Die Bilder werden in regelmäßigen Abständen digitalisiert und mit einem Programm umgewandelt. Auf diese Weise kann die Position der Tiere verfolgt und das Verhalten (Trinken, Fressen, Putzen) erkannt werden. Nach Schuster 1988 und Engelmann, unpubliziert. 261/bildanalyse-dros

war für diese Änderungen verantwortlich (Abbildung 14.20). Die Mutanten wurden  $per^s$  (per für Periode, s für short),  $per^l$  (l für long) und  $per^0$  (kein Rhythmus) genannt. 1984 wurde das Gen kloniert (ref) und 1986-1987 sequenziert (ref). Es besteht aus 8 Exons, von denen das erste nicht translatiert wird (Abbildung 14.20).

not found!

Abbildung 14.20: Schlüpfrhythmen und Aktogramme von Mutanten von *Drosophila* per Gen auf dem x-Chromosom zwischen zeste und white im Abschnitt 3 Bxx. 254/per-gen

Das kodierte Protein enthält

- konservierte Regionen, also wahrscheinlich Orte für Phosphorylierungen und Glykosylierungen
- eine Kerntranslokations-Sequenz NLS
- eine PEST Sequenz
- ein 270 Aminosäuren langes Motiv PAS, das mit sich selbst und anderen Proteinen in Wechselwirkung steht
- eine Thre Gly Wiederholung

#### 14.5.2 Vorkommen und räumliche Verteilung von PER in den verschiedenen Entwicklungsstadien.

PER wurde im Gehirn des sich entwickelnden Embryos gefunden, in den Larven und in den Fliegen (Abbildung 14.21). Bei letzteren kommt PER außer im Gehirn und den Sinneszellen der Augen auch in vielen anderen Geweben vor. Zellulär wurde es im Kern und im Zytoplasma nachgewiesen.

PER während der Entwicklung

fehlt noch: Charlotte

not found!

Abbildung 14.21: PER-Verteilung im Gehirn und den optischen Lappen von Drosophila melanogaster.255/PER-gehirn-dros

#### 14.5.3 Rückkopplungsmodell PER-TIM

Die per mRNA wird im Licht-Dunkel-Wechsel und im Dauerdunkel rhythmisch gebildet. Auch das PER Protein wird rhythmisch gemacht. Die maximale per mRNA Bildung geschieht in der frühen Nacht und geht der maximalen PER Bildung um etwa 4-6 Stunden voraus (Abbildung 14.22). Dieser lange Zeitraum zwischen Transkription und Translation beruht vermutlich auf der Prozessierung der mRNA und ist für die lange Periode des Rhythmus verantwortlich.



Abbildung 14.22: [Tagesrhythmus der per mR-NA und des PER Proteine im Licht-Dunkel-Wechsel und im Dauerdunkel] Verlauf der per mRNA und des PER Proteine im Licht-Dunkel-Wechsel und im Dauerdunkel ist tagesrhythmisch. Maximale per mRNA Bildung in der frühen Nacht. Maximale PER Bildung etwa 4-6 Stunden später. 256/per-mrna-PER

Ein weiteres Protein, TIM, das bei der Mutante timeless fehlt, wird ebenfalls rhythmisch gebildet und abgebaut.

PER und TIM hemmen durch Rückkopplung die Transkiption von per und tim und dadurch ihre eigene Synthese (Abbildung ??). Das per und tim Gen werden am Morgen aktiv. mRNAs der Gene akkummulieren während des Tages und bilden viel PER und TIM. Nach Beginn der Dunkelheit kooperieren PER und TIM miteinander (binden miteinander?) und können so zum Kern wandern. Dort unterbinden sie die Transkription ihrer eigenen Gene. per mRNA und tim mRNA werden nicht mehr gebildet, sie verarmen und die Konzentration von PER und TIM sinkt. Gegen Morgen ist die Proteinkonzentration so gering, dass die Gene nicht mehr gehemmt werden. Sie können nun wieder mRNA machen.

Licht verschiebt den Rhythmus, indem es TIM zerstört. Licht in der frühen Nacht verzögert das Anreichern von PER und TIM und verzögert dadurch den Rhythmus. Später in der Nacht gegebenes Licht beschleunigt den sowieso erfolgenden Zerfall von TIM und PER. Dadurch wird der Rhythmus beschleunigt. So wird erklärt, warum Licht zu bestimmten Phasen gegeben (frühe Nacht) den Rhythmus verzögert und zu anderen Phasen gegeben (späte Nacht) den Rhythmus verfrüht.

Im Dauerlicht sind Fliegen arrhythmisch. Sie verhalten sich wie Fliegen ohne tim-Gen. Auch das spricht dafür, dass Licht TIM zerstört.

Bei  $per^0$  wird ein PER gemacht, was nicht funktioniert: eine Aminosäure ist so mutiert, dass an dieser Stelle ein Stop-Codon entstand. Es entsteht ein Protein, das zu kurz ist und nicht mehr funktioniert. Dadurch fehlt der Partner für TIM. Die Produktion von tim und per mRNA wird also nicht gehemmt, ihre Konzentration ist dauernd hoch. Es gibt keinen Rhythmus der Proteinsynthese. Trotzdem wird im Licht-Dunkel-Wechsel TIM durch Licht zerstört. Im Dauerdunkel bleibt dagegen die Konzentration von TIM hoch. Ein einstündiger Lichtpuls genügt allerdings, um TIM zu zerstören.

Die Dimerisierung von PER und TIM ist bei  $per^l$  eingeschränkt. Dadurch wird die Periode verlängert.

PER wird im Laufe der Nacht phosphoryliert (EDERY\_94a). Die einzelnen phosphorylierten PER haben möglicherweise unterschiedliche Funktionen und Stabilitäten.

Hinweis auf Chronon-Konzept von Ehret.

#### 14.5.4 Kontrolle anderer rhythmischer Prozesse

Unklar ist noch, wie die Zelluhr andere Zeiger steuert. Geht das über circadian aktivierte Transkriptionsfaktoren? Sind sekundäre Botenstoffe beteiligt, die sich tagesperiodisch ändern und die Transkriptionsfaktoren beeinflussen können? 'Clock controlled genes'.

## Kapitel 15

## Augenuhren von Meeresschnecken

AnMeeresschnecken bestimmten (zum Beispiel Aplysia und Bulla) können die zellulären Mechanismen circadianer Rhythmen gut untersucht werden. Ihre Augen enthalten auch Neuronen mit circadianen Uhren. Diese steuern das Feuern der Nervenzellen. Dadurch kommt es in den Augennerven zu einem rhythmischen Aktionspotential, welches sich leicht messen lässt. Was im Nerven in Ruhe und bei Erregung abläuft, ist eingehend untersucht. Mit elektrischen und pharmakologischen Behandlungen können die Vorgänge gezielt beeinflusst werden.

#### 15.1 Einführung

An Meeresschnecken können die zellulären Mechanismen circadianer Rhythmen gut untersucht werden. *Besonders Aplysia* und *Bulla* wurden dazu verwendet. Ihre Augen dienen in erster Linie der Lichtaufnahme. Sie enthalten aber auch Neuronen mit einer circadianen Uhr. Diese steuert das Feuern der Nervenzellen. Dadurch kommt es in den Augennerven zu einem rhythmischen Aktionspotential, dem 'CAP' (compound action potentials, zusammengesetzte Aktionspotentiale, Jacklet (1969)). Die Augen lassen sich leicht isolieren und für längere Zeit in einem geeigneten Medium halten. Die elektrischen Ableitungen der CAP sind einfach. Was im Nerven in Ruhe und bei Erregung abläuft, ist eingehend untersucht. Mit elektrischen und pharmakologischen Behandlungen können die Vorgänge gezielt beeinflusst werden<sup>1</sup>. Die zellulären Mechanismen dieser circadianen Rhythmen können somit eingehend studiert werden.

Übersichtsartikel sind von Block et al. (1993), Block et al. (1996), Block et al. (1994), Colwell et al. (1992), Herzog and Block (1999), Jacklet (1989), Koumenis and Eskin (1992), Lickey et al. (1976), Whitmore and Block (1996).

Neben Aplysia californica und Bulla gouldiana wurden auch Navanax inermis, Haemonea vesicula und Bursatella leachii plei untersucht. Die systematische Stellung, Vorkommen und Biologie wird im folgenden kurz behandelt:

## 15.2 Systematik, Vorkommen, Biologie von Meeresschnecken

Der Stamm der Mollusken enthält ca. 128 000 Arten. Der Seehase Aplysia (Ordnung Tecti-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Da die beiden Augen eines Tieres sich sehr ähnlich verhalten, kann das paarige als eine gute Kontrolle verwendet werden



Abbildung 15.1: Gliederung der *Euthyneura* (früher: Hinterkiemer und Lungenschnecken). Aplysia gehört zu den Aplysiidae in der Familie der Aplysiaceae. Die Familie leitet sich von den *Cephalaspidea* ab, wie auch andere Familien der Hinterkiemer und Lungenschnecken. Bulla gehört zu den Bullidae, die Teil der Familie der *Cephalaspidea* sind. Aus Kilias (1967). m1-stam

branchia, Unterordnung Anaspida) gehört wie auch die anderen Meeresschnecken zu der Klasse der Gastropoden (Schnecken) und dort zur Unterklasse der Opisthobranchia (Hinterkiemer, Abbildung 15.1). Bulla gehört zur Unterklasse der Cephalaspidea in die Ordnung der Bullidae. Bursatella, Haemonea, Navanax, gehören ebenfalls zu den Cephalaspidea. Aplysia ist tagaktiv. Sie kommt in den Küstennahen Zwischengezeiten-Zonen des Pazifischen Ozeans zwischen Zentralkalifornien und Neumexiko vor. Die Tiere haben eine reduzierte Schale und einen großen Mantel (Abbildung 15.2). Mit ihm schwimmen sie durch Rückstoß. Das Verhalten von Aplysia ist gut untersucht. Vor allem die Gedächtnisleistungen des Tieres wurden von mehreren Arbeitsgruppen bearbeitet. Sie besitzen paarige Linsenaugen und weitere Lichtsinneszellen an der Körperoberfläche. Aplysia ernährt sich von Algen, zum Beispiel der Rotalge Gracilaria. Im Labor wird Salat verwendet (Michel (n.d.)). Im Sommer und bis in die Mitte des Herbstes pflanzen sie sich fort. Warme Temperatur  $(20^{\circ}C)$  scheint der wichtigste Auslöser zur Reproduktion zu sein, während photoperiodische Signale weniger wichtig sind (Kurztag erhöht die Eiablage, siehe Wayne et al. (1996)).

Bulla gouldiana (cloudy bubble snail) lebt in wärmeren Meeren auf sandigem Boden. Sie ist ein Allesfresser und lebt von Abfällen des Meeres (Detritus-Fresser). Im Gegensatz zu Aplysia ist sie nachtaktiv (Abbildung 15.3).

## 15.3 Morphologie und Anatomie der Augen und der Gehirnganglien

Die paarigen Augen von Apysia sind klein  $(600\mu m)$  und unauffällig. Das Auge stellt eine geschlossene Kapsel mit einer zentralen Linse dar (Abbildung 15.4). Der Augenbecher be-



Abbildung 15.2: Aplysia californica von der Seite (oben, Kopf links mit Antennen, Augen (rot), Atemröhre und Mantel). Unten: Tier von oben, zeigt zusätzlich Mantelsaum und Kiemen. Nach Levitan and Benson (1981). m2oapl,m2u-apl )



Abbildung 15.3: *Bulla gouldiana* (cloudy bubble snail) mit Kopf links, Augen innerhalb der weißen Flecken, Mantel um das dunkle Gehäuse. Aufnahme von C. Ehnert im Labor von S. Michel. m3-bul

steht aus zwei Schichten: Eine komplexe Retina mit 5000 Zellen und ein Neuropil mit sekundären Neuronen (R-, D- und H-Zellen). Die Retina enthält fünf Typen von Photorezeptoren und zwei Typen von Neuronen. Dorsaler und ventraler Teil des Auges unterscheiden sich. Die für den CAP Rhythmus zuständigen Neuronen kommen nur im ventralen Teil vor (Herman and Strumwasser (1984)).



Abbildung 15.4: Morphologie des *Aplysia* Auges (vertikale Skala 0.3 mm) mit (von rechts nach links) einfacher Cornea und sphärische Linse, Schicht pigmentierter Zellen (schwarz, mehrere Tausend Photorezeptoren und Stützzellen). Nächste Schicht besteht aus Fasern, Neuropil und etwa 1000 sekundäre Neuronen. Faser laufen an der Basis zusammen und bilden den optischen Nerv, der zum Cerebralganglion zieht. Nach Jacklet (1976). m4-apey

Das Gehirn von *Aplysia* besteht aus verschiedenen Kopfganglien (Cerebral- Pleural- und Pedalganglien). Es ist für *Aplysia* in Abbildung 15.5 dargestellt (Olson and Jacklet (1985)).

Das Auge von Bulla ist  $500\mu m$  groß (Abbildung 15.6 aus Roberts and Moore (1987)). Es enthält etwa 1000 große Photorezeptoren, kleine Photorezeptoren, zahlreiche pigmentierte Stützzellen und etwa 130 Neuronen (Basic



Abbildung 15.6: Auge von Bulla gouldiana. Von rechts nach links: Linse, Photorezeptor-Schicht, basale retinale Neuronen (BRN) an der Basis des Auges dreidimensional dargestellt, optischer Nerv mit Nerven-Scheide teilweise aufgeschnitten. Nach Roberts and Moore (1987). m06-buey

Retinular Neurons, BRN). Sie sind die circadianen Oszillatorzellen und ihre Axone ziehen mit 2000 anderen durch den optischen Nerv zum Neuropil. Im optischen Nerv befinden sich auch efferente Axone vom Gehirn. Die retinalen Zellen sind miteinander elektrisch gekoppelt (siehe Abbildung 15.7).

## 15.4 Circadiane Rhythmik der CAP, Elektrophysiologie

Auge mit Augennerv lassen sich leicht isolieren<sup>2</sup>. Der lange optische Nerv (10 mm) eignet sich für elektrische Messungen in Organ-Kultur. (Registriertechnik: Schlauchelektrode mit elektrischem Verstärker). Die Spontanaktivität von Neuronen schwankt tagesperiodisch im Licht-Dunkel-Wechsel und im Dauerdunkel und kann als CAP registriert werden (Abbildung 15.8 und 15.9). Am Morgen (circadiane Zeit CT 00) ist die CAP-Frequenz hoch, von der Abenddämmerung bis Mitternacht (CT

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Operationstechnik: xx



Abbildung 15.5: Gehirn von Aplysia californica. Das Auge ist mit dem Gehirn über den optischen Nerv verbunden, der aus Axonen von Photorezeptorzellen (PR), Axonen der circadianen Schrittmacherzellen (PN) und efferenten Nervenfasern zum Auge (E) von Nervenzellen im Cerebralganglion besteht. Zusätzliche efferente Neuronen ziehen über einen akzessorischen optischen Nerv zum Auge. Das Gehirn besteht aus verschiedenen Ganglien (cerebrales, pedales, pleurales und weiter vorn gelegene, nicht gezeigte) und ist mit dem Abdominalganglion verbunden. Dicke Linien zeigen Projektionen der PN mit verschiedenen Teilen des Gehirns und der Ganglien (durch radioaktive Markierung gezeigt). Kurze Pfeile deuten auf Regionen, wo CAPs von circadianen Schrittmacher-Neuronen in der Retina registriert werden können. Nach Olson and Jacklet (1985). m05-apbr



Abbildung 15.7: Modell der funktionellen Organisation der Retina von *Bulla gouldiana*. R (blau): Große Photorezeptorzellen, die die Linse des Auges umgeben, sind elektrisch miteinander gekoppelt (blaue Verbindungen mit Rechtecken). S (violett): kleine feuernde Photorezeptorzellen zwischen den großen. H (bräunlich): Kette kleiner retinaler Zellen, elektrisch mit den S-Zellen gekoppelt, die vorübergehend bei Belichtung gehemmt werden. BRN(rot): Basale retinale Neuronen sind Schrittmacherzellen; sie depolarisieren während Beleuchtung und erzeugen Aktionspotentiale. Neuriten der BRN´s koppeln elektrisch miteinander (bräunliche Linien mit Rechtecken) und hemmen (braune Linien mit kleinen senkrechten Balken) die H Zellen (und S-Zellen?). Zellen der Photorezeptor-Schicht scheinen die BRN´s (bräunliche Linien mit Rechtecken) zu hemmen. Axone an der Basis führen über den optischen Nerv zum Gehirn. Nach Block et al. (1993). m7-ret



Abbildung 15.9: Circadianer Rhythmus der CAP Amplitude (oben, blaue Kurve) und Frequenz (unten, rote Kurve) isolierter Augen im Dunkeln. Nach Benson and Jacklet (1977b). m09-cap-fanda



Abbildung 15.10: CAP-Rhythmus des optischen Nerven isolierter Augen von Aplysia (oben, grüne Kurve) und Bulla (unten, blaue Kurve), für acht Tage bei  $15^{0}$ C nach Übergang von einem Licht-Dunkel-Zyklus in Dauerdunkel registriert. Bulla ist nachtaktiv, während Aplysia tagaktiv ist. Nach Block et al. (1993). m10-cap



Abbildung 15.11: Präzision und Wellenform des CAP-Rhythmus von isolierten Augen von Bulla in der oberen Kurve. Die Häufigkeit der Maxima von Messungen von 377 Augenpräparaten ist als Funktion der Zeit dargestellt, zu der sie auftreten. Das Histogramm unten links zeigt das erste Histogramm der oberen Kurve vergrößert und in Bezug auf die erwartete Phase 0 des Dunkel-Licht-Übergangs. Unten rechts: Durchschnittliche Wellenform (rote Kurve, siehe auch Abbildung 15.10) von Messungen an 59 Augen-Präparationen. Sie besteht aus einem raschen Anstieg der CAP Frequenz und einem langsameren Abfall. Nach Block et al. (1993). m11- pre



Abbildung 15.8: CAP-Rhythmus isolierter Augen von Aplysia in einem Kulturmedium bei  $15^{0}$ C im Dauerdunkel registriert. Amplitude und Frequenz der CAP ändern sich circadian. Das gleiche gilt für die Frequenz der CAP-Ausbrüche und der Zahl der CAPs pro Ausbruch. Nach Benson and Jacklet (1977b). m8cap-rhythm

12 bis CT 18) niedrig. Im Dauerdunkel hält der circadiane Rhythmus an (Abbildung 15.10) und ist noch nach 2 Wochen Kultur zu beobachten (). Seine Periodenlänge beträgt in Seewasser 23-24 h (Mittelwert von 377 Messungen 23.74 h). In Nährmedien verlängert sie sich durch einige der darin befindlichen Aminosäuren um 1 bis 1.7 h (Eskin (1982)). Der Rhythmus ist erstaunlich präzise, wie Abbildung 15.11 zeigt. Die Temperaturabhängigkeit dieser Rhythmik ist gering (Abbildung 15.12). Zwischen 15 und 22.5<sup>o</sup>C beträgt der  $Q_{10}$  1.07. Unter 9<sup>o</sup>C hört allerdings die Temperaturkompensation auf (Benson and Jacklet (1977b)).



Abbildung 15.12: Periodenlänge des CAP Rhythmus eines optischen Nervs von *Aplysia* bei verschiedenen Temperaturen. Nach Benson and Jacklet (1977b). m12-tem

Hervorgerufen werden die CAPs durch synchrones Feuern der BRN-Population. Ferner gibt es noch weitere tagesperiodisch schwankende Parameter: die CAP-Burst-Frequenz, die Amplitude (wahrscheinlich durch die Zahl der feuernden sekundären Zellen bedingt), und kleine neuronale Pulse, die um 180<sup>0</sup> zur CAP Rhythmik Phasen-verschoben sind und möglicherweise für die Kopplung zwischen den Augen wichtig sind (sie werden durch Licht gehemmt (Geusz and Page (1990), Herzog and Block (1992)). Die kleinen neuronalen Pulse werden von retinalen Zellen in der Retinaschicht erzeugt und durch die BRN's beeinflusst.

Die CAP-Rhythmen kommen durch eine intrazelluläre Uhr zustande: Werden die CAPs unterdrückt oder gefördert, beeinflusst das die die Periodenlänge und die Phase nicht. Der Mechanismus, durch den das CAP-Feuern erzeugt wird, ist also von der Uhr zu unterscheiden, die das CAP-Feuern circadian moduliert. Die lokomotorische Aktivität der Tiere verläuft parallel zum CAP Rhythmus.

#### 15.4.1 Mechanismus des CAP Oszillators

Zum Mechanismus des CAP Oszillators sind vor allem an *Bulla* Versuche gemacht worden. Die etwa 130 'Uhrenneurone' (BRN) im Neuropil in der Nähe des optischen Nerven sind für die circadiane Rhythmik verantwortlich. Sie sind elektrisch miteinander gekoppelt.

Intrazelluläre Messungen zeigten, dass das Membranpotential und die Leitfähigkeit tagesperiodisch schwanken (Abbildung 15.13, Michel et al. (1993)). In der subjektiven Tagzeit ist das Membranpotential niedrig, in der subjektiven Nachtzeit hoch. Im hyperpolarisierten Zustand (subjektive Nachtzeit) sind einwärts gleichrichtende  $K^+$ -Kanäle, Leckkanäle und  $Cl^-$ -Kanäle geöffnet (Abbildung 15.14). Diese Transmembranflüsse und Ca<sup>2+</sup>-Einströme sind zwar für die circadian gesteuerten Vorgänge wichtig (McMahon and Block (1987)). Der circadiane Rhythmus selbst hat wohl nichts damit zu tun (Khalsa et al. (1993b)). Vielmehr spielen dabei Transkription und Translation eine kritische Rolle (Block (1996), Whitmore and Block (1996)). Einzelheiten sind bisher nicht bekannt.



Abbildung 15.14: Membran-Modell der Augen-Uhr. Während des subjektiven Tages (obere Zelle) sind die Schrittmacher-Zellen (BRN) in den Augen von *Bulla* depolarisiert (-50mV). Aktionspotentiale werden spontan generiert, die wahrscheinlich zu einem dauernden Ca<sup>2+</sup>-Einstrom führen. Während der subjektiven Nacht (untere Zelle) sind die BRN mehr hyperpolarisiert (-65mv). Die Zellen feuern nicht. Nach Block et al. (1994). m14-mem

Ein wichtiges Element der Zellzyklus-Regulation, Tyrosin-Phosphorylierung und



Abbildung 15.13: CAP Rhythmus (oben, rote Kurve, Impulse pro Stunde als Funktion der Zeit) und Membran-Leitfähigkeit (untere Kurven) der BRN des *Bulla* Auges. Semi-intakte Augenpräparation. Membranpotential-Änderungen mit Strom-clamp Methode zu Zeiten registriert, die durch Zahlen im oberen Diagramm angegeben sind: Diagramm (1 (blau) und 5 (schwarz) vor Lichtbeginn, 2 (rot) und 6 (violett) nach Lichtbeginn, 3 (cyan) vor Lichtbeginn, 4 (cyan) nach Lichtbeginn). Nach Michel et al. (1993). m13-mic

Dephosphorylierung, ist auch für den circadianen Rhythmus im Auge von *Bulla* bedeutend (Roberts et al. (1992), Sankrithi and Eskin (1999)). Durch Proteinkinase-Aktivität werden dabei K-Kanäle beeinflusst. Dadurch ändert sich die K-Leitfähigkeit und das Membranpotential (Krucher et al. 1994).

Auch isolierte BRN von *Bulla* zeigen über mindestens zwei Tage hinweg circadiane Rhythmen: die spontanen Leitfähigkeitsänderungen sind hoch in der späten subjektiven Nacht und niedrig am subjektiven Morgen (Michel et al. (1993)).

Bei Aplysia wurden auf Licht reagierende monopolare Neuronen in Kultur gehalten und Membran- und Aktionspotentiale gemessen. Es dürfte sich bei ihnen um Ausgangs-Neuronen der circadianen Augenuhr handeln (Jacklet and Barnes (1993)).

## 15.5 Synchronisation und Phasenverschiebungen des CAP-Rhythmus

Der CAP-Rhythmus kann auf mindestens zwei Wegen synchronisiert werden: Ein photischer Weg synchronisiert den Oszillator auf den Licht-Dunkel-Wechsel, und ein efferenter Eingang ermöglicht dem Gehirn, den CAP-Rhythmus zu beeinflussen.

Licht verschiebt die Phase des CAP-Rhythmus unterschiedlich stark und in verschiedene Richtungen (zu früheren oder späteren Zeiten) je nach dem Zeitpunkt des circadianen Systems. Eine Phasenresponsekurve beschreibt diese Effekte (Abbildung 15.16). Auch ein Übergang von Dauerlicht zu Dauerdunkel bestimmt die Phasenlage des CAP-Rhythmus.

Photorezeptoren des Gehirns spielen dabei keine Rolle. Das wurde in einem Versuch gezeigt, bei dem ein Auge-Gehirn-Präparat in einer besonderen Kammer registriert wurde. Die Augen und das Gehirn konnten dabei getrennt beleuchtet werden. Efferente Fasern im optischen Nerv gaben dem Auge keine Information über die Belichtung im Gehirn. Wohl aber aktivierten oder modulierten sie die circadiane Funktion im Auge (Lickey (1981), Prichard (1981)). Die efferenten Wege geben also neurale Informationen vom Zentralnervensystem an die Augenoszillatoren weiter (Koumenis and Eskin (1992)). Es ist noch nicht bekannt, ob die okularen Schrittmacher mit den extra-okularen zusammenwirken, um die circadianen Ausgänge des Tieres zu steuern.

Licht-Dunkel-Zyklen synchronisieren die retinale Uhr und ihre CAP Rhythmen in vivo und in vitro. Licht erhöht den cGMP-Spiegel. Dadurch werden Membranen depolarisiert und Calciumflüsse in den Schrittmacher-Neuronen induziert. Die Proteinsynthese wird ebenfalls beeinflusst (erhöht, siehe Koumenis and Eskin (1992)). Als Photopigment dient ein Opsin-artiges Protein (Borbely and Wirz-Justice (1982), Block and McMahon (1983), Geusz and Page (1991), Jacklet and Barnes (1993), Geusz et al. (1997)).

#### 15.5.1 Efferente Einflüsse des Gehirns

Der CAP-Rhythmus der Augen wird nicht nur durch Licht synchronisiert, sondern auch vom Gehirn beeinflusst. Efferente Fasern vom ZNS zu den Augen verschieben die Phase des CAP-Rhythmus. Serotonin (5-HT) dient als Transmitter (Corrent et al. (1979)). Dabei werden über den cAMP-Spiegel (Erhöhung) Membranen hyperpolarisiert, indem die K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit erhöht wird (Corrent et al. (1982)). Auch hier spielt die Proteinsynthese eine Rolle.

Die beiden Eingänge Licht und Serotonin laufen in einem gemeinsamen Weg zusammen: Membranpotentiale der Schrittmacherzellen werden über Calcium (als sekundärem Botenstoff) geändert. Während der subjektiven Nacht sind die Zellen hyperpolarisiert und inaktiv. Während der subjektiven Nacht werden sie depolarisiert. Dadurch werden Phasenverschiebungen induziert und die Phase des CAP Rhythmus eingestellt.

Die Phasenverschiebungen durch efferente Transmitter vom Zentralnervensystem (Serotonin bei Aplysia, FMRFamide bei Bulla) unterscheiden sich von denen des Lichtes. Keine Phasenverschiebungen (so genannte Totzone) gibt es während der subjektiven Nacht, während Licht in dieser Zeit die Phase maximal verfrüht oder verspätet. Licht hat seine Totzone während des subjektiven Tages. Efferente Transmitter dagegen verfrühen oder verzögern den Rhythmus jetzt maximal. Offenbar bewirken Licht und efferente Tansmitter unterschiedliche biochemische Änderungen in den Neuronen. Licht und Serotonin wirken dabei antagonistisch. Die Interaktion der Signale Licht und Serotonin ist jedoch nicht einfach subtraktiv zu allen Phasen, sondern komplexer (Colwell (1990)).

Serotonin moduliert das Verhalten und physiologische Prozesse von Aplysia. Es wirkt über verschiedene Serotonin-Rezeptoren (Angers et al. (1998)), die über sekundäre Messenger Phospholipase C aktivieren. Serotonin verschiebt phasenabhängig den CAP Rhythmus. Es muss also auf eine Komponente des Oszillators wirken. Es handelt sich dabei um cAMP. cAMP aktiviert eine cAMP-abhängige Proteinkinase (Zwartjes and Eskin (1990)) und die K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit wird erhöht (Corrent et al. (1982)). Es kommt zur Hyperpolarisierung der Membranen (Colwell et al. (1992)).

Phasenresponsekurven durch 6 Stunden niedrige  $Ca^{2+}$ -EGTA-Lösungen und durch hyperpolarisierende niedrige Na/niedrige K-Lösungen ähneln sich. Die Effekte addieren sich nicht, wenn beide Behandlungen kombiniert werden. Das spricht für einen gemeinsamen Mechanismus, über den der zugrunde liegende Oszillator durch die beiden Behandlungen beeinflusst wird. Wahrscheinlich ist dieser gemeinsame Mechanismus ein Transmembran-Calciumfluss. Er kommt durch periodische Depolarisationen der Membranen während des subjektiven Tags zustande (Khalsa and Block (1990)).

Da extrazelluläres  $Ca^{2+}$  zum Synchronisieren des CAP Rhythmus wichtig ist, wurde untersucht, ob es auch für den circadianen Rhythmus selbst wichtig ist. Das ist jedoch nicht der Fall (Khalsa et al. (1993b)).

6 Stunden Cl<sup>−</sup>-Entzug zu verschiedenen Phasen des Zyklus verfrüht den CAP-Rhythmus in der späten subjektiven Nacht, hat aber am späten subjektiven Tag nur einen geringen (verfrühenden) Effekt. In beiden Fällen werden die BRN-Zellen hyperpolarisiert. Der Cl-Effekt kann nicht allein über Membranpotential-Änderungen erklärt werden (Michel et al. (1992)).

## 15.6 Mechanismus der Lichtwirkungen

Licht wirkt über eine intrazelluläre Kaskade: Es depolarisiert das Membranpotential der Schrittmacherzellen, bewirkt Ca<sup>+</sup>-Einstrom und verschiebt die Phase der Rhythmik. In der frühen subjektiven Nacht wird der Rhythmus verzögert, in der späten subjektiven Nacht verfrüht (Abbildung 15.15 und 15.16). Licht wird über die R- und H-Zellen der Photorezeptoren aufgenommen (cGMP) und das Signal an die D-Zellen des Aplysia-Auges (BRN bei Bulla) weitergeleitet (siehe Abbildung 15.7). Die D-Zellen des Auges haben eine neurosekretorische Funktion und entsprechen den Augenstielen der Crustaceen. Als Neurotransmitter wirken die Catecholamine DO-PA und Dopamin (Adrenalin und Noradrenalin kommen bei Schnecken nicht vor). Von den D-



Abbildung 15.15: Ein 6 stündiger Lichtpuls (rotes Rechteck) wurde einem Aplysia Augenpräparat angeboten und die CAP vom optischen Nerv registriert (rote Punkte und Kurve). Die andere Augenpräparation des gleichen Tieres diente als unbehandelte Kontrolle (grüne Punkte und Kurve). Die Phase der roten Kurve wird durch den Lichtpulse verfrüht. Das Tier wurde in einem 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Zyklus gehalten. Zeit der 12 stündigen Lichtperiode durch gelbe Flächen markiert, obwohl Augen vor und nach der Beleuchtung in Dauerdunkel gehalten wurden. Nach Eskin (1977). m15-lite

Zellen (BRN) werden die CAP erzeugt. Sie werden über elektrische Verbindungen (gap junctions) und möglicherweise Hormone an die Zielorgane weitergeleitet, wo sie die lokomotorische Aktivität tagesrhythmisch steuern.



Abbildung 15.16: Lichtpuls-Phasenresponsekurven für *Bulla* (blau) und *Aplysia* (grün) Mitte des sechsstündigen Lichtpulses auf der x-Achse. Bulla Kurve nach Block and McMahon (1984) und Aplysia Kurve nach Corrent and Eskin (1982). dM16-prc

Im Dauerlicht ist übrigens die Periodenlänge der CAP Rhythmik um eine Stunde kürzer als im Dauerdunkel (Benson and Jacklet (1977a)). Im längeren Dauerlicht dämpft der Rhythmus aus. Er bleibt dann im Zustand niedrigster CAP-Frequenz (Benson and Jacklet (1977a)). Das ist der gleiche Zustand, der auch durch niedrige Temperatur induziert wird.

### 15.7 Weitere circadiane Zentren?

Da auch Tiere, denen die Augen entfernt wurden, auf einen Licht-Dunkel-Wechsel noch in ihrem lokomotorischen Verhalten rhythmisch reagieren (und im Dauerdunkel für einige Tage Freilauf zeigen), muss mindestens ein weiterer Schrittmacher vorhanden sein. Er befindet sich im Cerebralganglion, aber seine genaue Lage ist noch nicht bekannt. Für einen lang anhaltenden Rhythmus sind jedoch die Augen nötig.

Da die lokomotorische Aktivität der Tiere mit operativ entfernten Augen weiterhin auf einen Licht-Dunkel-Wechsel synchronisierbar ist, müssen weitere Photorezeptoren vorhanden sein. Diese extraokulären Photorezeptoren haben eine breite Empfindlichkeit für Wellenlängen. Sie sind noch nicht charakterisiert. Möglicherweise befinden sie sich in der Mantelhaut, im Abdominalganglion, Cerebralganglion oder den Oraltentakeln. Auch rotes Licht wirkt, während es beim CAP-Rhythmus unwirksam ist.

Werden bei der nachtaktiven *Bulla* die Augen entfernt, ist das Tier tagaktiv.

## 15.8 Bedeutung der Proteinsynthese für die Tagesrhythmik:

Werden isolierte Augen von Aplysia und Bulla für einige Stunden mit Translationshemmern behandelt, wird die circadiane Uhr beeinflusst (Jacklet (1980), Yeung and Eskin (1988), ?). Wird die Transkription gehemmt, ist der Zeitraum der Wirkung größer als bei Translationshemmern (über den ganzen subjektiven Tag hinweg, Raju et al. (1991), Khalsa et al. (1996)). Die Ergebnisse zeigen, dass Transkription und Translation am Mechanismus des circadianen Rückkopplungskreises beteiligt sind (Koumenis et al. (1996)).

Versuche mit Translationshemmern zeigen (Koumenis et al. (1996)): Puromycin<sup>3</sup>, Aniso $mycin^4$  und Cycloheximid<sup>5</sup> bewirken alle als Puls gegeben eine Phasenverschiebung, deren Größe und Richtung vom Zeitpunkt der Darbietung abhängt (Khalsa et al. (1992)). Permanent angeboten ändern diese Inhibitoren die Periodenlänge des Rhythmus. Allgemeine Stoffwechselinhibitoren haben den gleichen Effekt wie die mehr spezifisch wirkenden Proteinsynthesehemmer. Offenbar handelt es sich um synthetische Prozesse mit hohem Energiebedarf. Es sind aber keine Nebeneffekte, da Anisomycinabkömmlinge ohne Proteinsynthese-Hemmeffekt keine Phasenverschiebung bewirken.

Aber auch die Transkription ist am CAP-Rhythmus beteiligt. Kritische mRNA's werden über Nacht gespeichert und am Morgen in Proteine translatiert. Der Transkriptionshemmer DRB verschiebt als Puls gegeben den Rhythmus und verlängert die Periode, wenn er permanent angeboten wird. Es wurde nach 'putative oscillator proteins' (POP's) gesucht und acht gefunden. Drei wurden charakterisiert, die sowohl bei Belichtung als auch bei Serotoningabe gebildet werden. Sie müssen in irgendeiner Weise den circadianen Augenoszillator von Aplysia beeinflussen (Koumenis and Eskin (1992), Koumenis et al. (1995)). POP01 ist ein Lipocortein (Ca<sup>2+</sup> Phospholipid-Bindeprotein), das die PLA-2 hemmt. In einer anderen Untersuchung wurde ein Licht- und Serotonin-reguliertes Annexin im Zentralnervensystem und Auge identifiziert. Es scheint an intrazellulären Signalmechanismen beteiligt zu sein, die letztlich auch den circadianen Rhythmus modulieren (Kerschbaum et al. (1997)). Es wurde deshalb vermutet, dass der Arachidonsäure-Stoffwechsel beim circadianen System des *Aplysia*-Auges eine Rolle spielt. Tatsächlich kann ein LOX-Hemmstoff (Nordihydroguaiaretinsäure) den Rhythmus phasenverschieben (Raju et al. (1993)). Ein weiteres Augen-spezifisches Protein wurde bei *Aplysia* gefunden und ein Antiserum dagegen hergestellt. Es konnte benutzt werden, um die Projektion von Photorezeptor- und Schrittmacher-Neuronen zu identifizieren (Strack and Jacklet (1993)). Allmählich scheint sich das Chronoskelett des CAP-Oszillators herauszuschälen.

### 15.9 Beeinflussungen der circadianen Rhythmen

Behandlungen, die entweder die Phase oder die Periodenlänge des Oszillators beeinflussen, können helfen, den zugrunde liegenden Mechanismus zu verstehen.

Niedrige Temperatur für längere Zeit gegeben verschiebt die Phase des CAP-Rhythmus. Unter bestimmten Bedingungen kann dabei der Rhythmus in zwei Unter-Populationen aufspalten, deren Phasen um 120<sup>0</sup> gegeneinander verschoben sind. Nach einigen Zyklen haben sich die beiden Populationen von Oszillatoren wieder synchronisiert. Offenbar sind sie stark miteinander gekoppelt (Benson and Jacklet (1977c)).

Niedriger pH zu einer kritischen Phase gegeben (nahe dem subjektiven Morgen) stoppt den CAP Rhythmus von *Bulla* (Khalsa et al. (1991)).

Pentobarbital (ein Anästhetikum) verschiebt die Phase des CAP Rhythmus und unterbindet Licht- und K<sup>+</sup>-induzierte Phasenverschiebungen. Wahrscheinlich geschieht das über verrin-

 $<sup>^{3}\</sup>mathrm{bewirkt}$ unvollständiges Verknüpfen der Polypeptidketten

 $<sup>^4\</sup>mathrm{hemmt}$  die Transferreaktion nach der Aminoacyl-t<br/>RNA-Bildung

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>hemmt die 80s Ribosomen

gerte einwärts gerichtete  $Ca^{2+}$ -Ströme (Khalsa et al. (1995)).

Die Periode des CAP Rhythmus wird verkürzt, wenn die Cl<sup>-</sup>- Leitfähigkeit gehemmt wird. Offenbar sind Chloridkanäle für den circadianen Rhythmus von Bedeutung. Verkürzungen der Periode circadianer Rhythmen wurden bisher selten gefunden (Khalsa et al. (1990)).

LiCl (Abbildung 15.17) und noch stärker Rb-Cl verlängern die Periode des *Bulla* CAP-Rhythmus (Khalsa et al. (1993a)). Auch Dauerlicht verlängert die Periode. Beides zusammen verlängert stärker als die Einzelbehandlungen (Khalsa et al. (1993a)). D<sub>2</sub>O verlängert die Periode Konzentrations-abhängig (Benson and Jacklet (1977b)).

Der circadiane CAP-Rhythmus wird mit dem Alter der Tiere verlangsamt. Sowohl Periodenlänge als auch Phasenwinkel erhöhen sich (Abbildung 15.18 Skene et al. (1999)). Das Verhältnis von Transkription zu Translation steigt mit dem Alter. Die Periodenverlängerung scheint darauf zu beruhen und ist somit eine Folge molekularbiologischer Vorgänge des Oszillators. Ältere Tiere mit trüben Linsen zeigen einen gedämpften Rhythmus oder Arrhythmie. Ihre Retina ist stark degeneriert.

## 15.10 Ausgänge des circadianen Systems

Die rhythmische Aktivität der Schrittmacher-Neuronen der Augen von *Aplysia* und *Bulla* wird über Neuronen zum Gehirn gemeldet. Die Signale wurden in verschiedenen Konnektiven der Gehirnganglien im gesamten Gehirn nachgewiesen (Olson and Jacklet 1985 (1985)).

Dazu wurde ein Antiserum für ein Augenspezifisches Protein benutzt. Es färbte die Zielgebiete der optischen Nervenfasern im zerebralen optischen Ganglion, die zerebralen optischen



Abbildung 15.18: Periodenlänge des CAP Rhythmus als Funktion des Alters. Nach xx. m18-age

Trakte (synaptische Austauschgebiete?) und die Projektionen der optischen Trakte vom Zerebralganglion zu den verschiedenen Kopfnerven und Zwischen-Ganglion Konnektiven. Die Intensität der Immunoblot-Färbung zeigt keinen circadian Rhythmus. Das nachgewiesene Protein könnte daran beteiligt sein, die retinalen afferenten Pfade einschließlich der Axone der Schrittmacher-Neurone zu erhalten oder zu regulieren (Strack and Jacklet (1993)).

Das Ruhepotential ist nachts höher als am Tage, wodurch sich die Erregbarkeit der Membranen der Schrittmacher-Neuronen ändert (Ralph and Block (1990)). Die circadiane Uhr scheint abends K<sup>+</sup>-Kanäle zu öffnen, wodurch die Zellen hyperpolarisieren. Abends schließen sie die K<sup>+</sup>-Kanäle, wodurch die Zellen depolarisieren. Damit erhöht sich das Feuern der Neuronen (Michel et al. (1993)). Was dann passiert, ist noch nicht gut untersucht. Die BRN-Zellen von *Bulla* wirken antiphasisch auf 'spiking retinal cells' (Geusz and Block (1992).

Isolierte Retinas von *Bulla* geben Melatonin circadian an das Kulturmedium ab (Abran et al. (1994)). Bei *Aplysia* wurde ein Melatonin-Rhythmus in den Augen und (phasenverschoben)



Abbildung 15.17: Applikation von Lithiumionen zum Medium, in welchem die Augen von Bulla gehalten werden, verlängert die Periode des CAP Rhythmus (oben: blaue Kurve für Kontrolle, rote Kurve mit  $\text{Li}^+$ ) in einer Dosis-abhängigen Weise (unten). Nach Khalsa et al. (1993a). m17-lith

im Cerebral-Lobus gefunden (Abran et al. (1994)).

Welche Rolle die circadiane Augen-Uhr spielt, ist unbekannt. Die Sehfunktion scheint dadurch nachts erhöht zu werden (Geusz and Page (1990)), wie das auch von anderen Tieren her bekannt ist und auch für den Menschen gilt.

#### 15.11 Interaktionen

Obwohl die circadianen Oszillatoren in den Schrittmacherzellen der Retina liegen und Eingänge und Ausgänge besitzen, sind sie nur ein Teil eines größeren circadianen Systems. Efferente Eingänge gibt es nicht nur von den Gehirnganglien, sondern auch vom contralateralen Auge.

Wird in einem Präparat mit beiden Augen von Bulla der CAP Rhythmus des einen durch  $Li^+$ verlängert und der des anderen durch  $Cl^{-}$ -Verarmung beschleunigt, stellt sich keine stabile Phasenbeziehung ein. Das spricht für eine schwache Kopplung zwischen den beiden Augen. Ist das Augenpräparat auch mit dem Gehirn verbunden, verlängert sich die Freilaufperiode. Demnach müssen efferente Signale vom Gehirn die Periode beeinflussen. Möglicherweise beeinflussen diese auch die Phasenverschiebung (Page and Nalovic (1992)). Die Kopplung zwischen den paarigen Augenuhren geschieht über die Cerebralkommisur (Roberts and Block (1983)). Als Neurotransmitter dient das Peptid FMRF Roberts and Moore (1987)).

Eine Synchronisation der lokomotorischen Aktivitätsrhythmik ist in einem Licht-Dunkel-Wechsel (200 Lux) auch bei augenlosen Tieren möglich. Die Morgendämmerung wird aber nicht mehr antizipiert. Unter konstanten Bedingungen und bei augenlosen Tieren verschwindet die Rhythmik langsam, aber nicht immer völlig (Lickey et al. (1977)). Das heißt also, dass neben dem Schrittmacher für den CAP-Rhythmus des Augennervs, der die lokomotorische Aktivität treibt, noch ein anderer Schrittmacher der lokomotorischen Aktivität vorhanden ist.

Die Neuronen der BRN projizieren in die Cerebral- und Pleuralganglien und in die Abdominalkonnektive. Viele Fasern kreuzen zu den contralateralen Ganglien hinüber. Faserendigungen wurden im Cerebralneuropil gefunden (Lacroix et al. (1991)).

## 15.12 Modelle des circadianen Systems

Ein sehr einfaches System eines Rückkopplungs-Mechanismus kann schwingen, wenn die Parameter und die Verknüpfung richtig gewählt werden (Abbildung 15.19).



Abbildung 15.19: Minimalsystem eines Oszillators: ein (nicht schwingender Vorgang (linker Pfeil) wird verstärkt (Amp) und wirkt nach Zeitverzögerung (Delay) auf den Vorgang zurück. Nach Friesen und Block84. m19-osc

Zunächst wurde mit formalen Modellen versucht, die Augenuhr von Aplysia und Bulla zu beschreiben. Die Eingänge zur Uhr, der eigentliche Uhr-Mechanismus und die Ausgänge der Uhr wurden mit Vorgängen in den BRN in Beziehung gesetzt (Abbildung. 15.20). Nachdem die zugrunde liegenden Mechanismen besser bekannt waren, wurden biochemische und elektrophysiologische Modelle aufgestellt (Abbildung 15.21, Block et al. (1993)). Ein Rückkopplungs-Relaxations-Oszillator-Modell wurde für den CAP Rhythmus im Aplysia-Auge vorgeschlagen (Abbildung 15.23, Benson



Abbildung 15.20: Formale Komponenten des circadianen Systems: Die circadiane Uhr (in der Mitte, C und D, ~) wird durch Signale (Zwischenstufen A und B) mit der Außenwelt synchronisiert (zum Beispiel durch den Licht-Dunkel-Wechsel). Ausgänge (E und F) der Uhr steuern Vorgänge in den Zellen circadian. Nach Block et al. (1993). m20-com

and Jacklet (1977c)). Es benutzt das von Lewis (1999) erweiterte Johnson/Karlsson'sche Rückkopplungsmodell (Abbildung 15.22, Johnsson and Karlsson (1972)). Eine Energiebedürftige Phase wird von einem passiven Diffusionsprozess abgelöst. Die Synthese einer Substanz C kontrolliert die CAP Frequenz. Die Konzentration von C schwankt um einen Referenzwert R. Das Modell erklärt eine Reihe von Versuchsergebnissen mit Licht- und Kältepulsen, mit Dauerlicht und schwerem Wasser. Auch das Aufspalten in zwei rhythmische Komponenten kann erklärt werden.

## 15.13 Evolution retinaler Uhren

Circadiane Uhren haben sich möglicherweise zusammen mit Licht-perzipierenden Molekülen entwickelt, lange bevor sich Photorezeptorzellen und Augen spezialisierten. Strukturelle Homologien zwischen Molekülen, die Bestandteile des Uhr-Mechanismus sind, und phylogenetisch alten Photopigmenten lassen vermuten, dass moderne Uhren-Proteine im Laufe der Evolution aus primitiven Licht-empfindlichen Proteinen entstanden (Crosthwaite et al. (1997)). Die Funktion von Opsinen lässt sich zum Beispiel leicht durch Austausch einzelner Aminosäuren so ändern, dass sie sich an die Lichtsituation der Umwelt anpasst. Ein circadianes Rückkopplungssystem könnte sich aus primitiven Photopigmenten entwickelt haben, die dann auf ihre eigene Transkription einwirkten. Das photoaktive gelbe Protein der Prokaryonten könnte ein Beispiel dafür sein. Solche Entwicklungen mögen mehrfach stattgefunden haben mit verschiedenen Photopigmenten als Ausgang und die Ursache sein für die verschiedenen Uhren-Mechanismen, die man unter den Stämmen der Organismen findet.

Augen sind mindestens 40 mal unabhängig voneinander im Laufe der Phyllogenie entstanden (Siegel and McGinty (1977)). Man müsste untersuchen, ob primitive Augen oder Augenflecken circadiane Oszillatoren besitzen. Unter den Vertebraten besitzen bereits die Neunaugen (*Petromycon marinus*) Augenuhren (Menaker et al. (1997)). Neunaugen spalteten sich bereits vor 450 Millionen Jahren von anderen Vertebraten ab.

Eine Ausnahme bilden die *Chelicerata* (Skorpione, Pfeilschwanzkrebse und Spinnen) und *Crustaceae*. Hier besitzen die Augen keine circadiane Uhren. Ihre Funktion und Struktur wird stattdessen durch efferente Signale von den optischen Lappen gesteuert (Barlow (1983), Fleissner and Fleissner (1988), Fleiss-



Abbildung 15.21: Modell für Entstehung des Rhythmus und der Synchronisation durch Licht bei *Bulla*. Der Rhythmen wird durch eine Calcium/Protein-Synthese Rückkopplungsschleife erzeugt.  $Ca^{2+}$  fließt passive aus intrazellulären Speichern aus. Dadurch steigt die Konzentration des  $Ca^{2+}$ im Cytoplasma. Das führt zur Synthese kritischer Proteine, die dann  $Ca^{2+}$ -pumpen aktivieren. Sie reduzieren den  $Ca^{2+}$ -Spiegel wieder und damit ist der Zyklus komplett. Die Elemente außerhalb der Uhr (violetter Kasten) repräsentieren die transmembrane Synchronisations-Schleife. Rechteckige Kästen sind variablen, quadratische Kästen mit d sind Zeitverzögerungen. Rote Linien bedeuten kausale Zusammenhänge. mit Pfeil wird Aktivierung, mit kurzem Balken Hemmung angedeutet. NR sind Eingänge, die nicht rhythmisch sein müssen. Nach Block et al. (1993). m21-mod



Abbildung 15.22: Black-box Darstellung des Rückkopplungsmodell des CAP Rhythmus: Der Oszillator besteht aus einem Referenzwert r, der dauernd mit dem Ausgangs-Element c verglichen wird. Wenn die Konzentration von c niedriger wird als r, wird ein Schalter geschlossen und nach einer gewissen Zeitverzögerung ein Synthetisator aktiviert. Sein Produkt c reichert sich in einem Akkumulator an. Von diesem beeinflusst das Produkt c einen Effektor. Gleichzeitig wird er zurück gekoppelt zu der vergleichseinheit und zu einer Verlust-Funktion, die den Akkumulator negativ beeinflusst. Licht wird über eine Photorezeptor perzipiert und erzeugt ein Signal, das den Referenzwert r reduziert (-). Im Dunkel kehrt r auf seinen Gleichgewichtswert zurück. Nach Benson and Jacklet (1977c). m22-fbm



Abbildung 15.23: Verhalten des Rückkopplungsmodells für CAP Rhythmen (siehe Abbildung 15.22). Die Konzentration des Ausgangselementes c (blaue Kurve) ist zusammen mit dem r-Wert gezeigt, bei dem der Schalter nach einer Zeitverzögerung an- oder ausgeschaltet wird (rote Kurve). Das Diagramm rechts (grün) zeigt die Schalter-Funktion f(c-r) als Funktion von (r-c). Nach Benson and Jacklet (1977c). m23-bens

ner and Fleissner (2001b)).

## Kapitel 16

# Circadiane Rhythmen beim Schimmelpilz *Neurospora*

In diesem Abschnitt werden wir uns mit circadianen Rhythmen bei Pilzen beschäftigen. Als Beispiel dient der Brotschimmel Neurospora crassa. Er wächst auf einem Substrat und bildet Lufthyphen, die tagesperiodisch Konidiosporen bilden. Die Vorteile, mit Neurospora zu arbeiten, werden dargestellt. Dazu gehören die vielen bekannten Mutanten, von denen einige das Uhrwerk, die Eingänge oder die Ausgänge betreffen. Der Rhythmus kann durch Licht, Temperatur und Substanzen beeinflusst werden. Die molekularen Grundlagen der Uhr und ihre Synchronisation durch Zeitgeber sind zum Teil bekannt. Das circadiane System von Neurospora scheint komplizierter zu sein als bisher angenommen.

## 16.1 Vorteile von *Neurospora* für circadiane Studien

Fadenförmige Pilze sind am engsten mit den Tieren verwandt, wie neuere Untersuchungen belegen (Wainright (1993)). Daher sind Untersuchungen an Tagesrhythmen von Pilzen von großer Bedeutung und können möglicherweise helfen, auch die Mechanismen der circadianen Rhythmen bei Tieren zu verstehen. Pilze sind außerdem genetisch und biochemisch zum Teil gut untersucht. Das gilt besonders für Neurospora crassa, einem Ascomyceten. Er kommt eigentlich in den tropischen und semi-tropischen Gebieten vor, ist aber inzwischen Welt-weit verbreitet. Sein Entwicklungszyklus und Generationswechsel ist in Abbildung 16.1 beschrieben. Es gibt einen sexuellen und einen asexuellen Fortpflanzungszyklus. Ascosporen werden in Asci gebildet, die sich in Perithecien befinden. Ferner werden von Neurospora auch asexuelle Konidien gebildet. Dazu differenziert sich das Mycel in Lufthyphen, die dann die Konidien formen (zur Musterbildung bei Neurospora crassa siehe Deutsch et al. (1993); siehe auch Genetics Stock Center's World Wide Web site (n.d.)). Das Umschalten zwischen undifferenziertem Mycel und Lufthyphen wird tagesperiodisch gesteuert. Die Periodenlänge des Rhythmus beträgt beim Wildtyp 21.6 Stunden (Dunlap (1993)).

Neurospora crassa eignet sich für Untersuchungen circadianer Rhythmen, weil er ein einfacher, primitiver eukaryontischer Organismus ist, der sich leicht züchten lässt. In Flüssigkultur bildet er große Mengen Mycel, das für biochemische Untersuchungen verwendet wird und wurde. Der Pilz ist haploid, leicht kreuzbar, genetisch intensiv untersucht und es gibt viele Mutanten. Die Generationszeit ist kurz. Auch



Abbildung 16.1: Entwicklungszyklus und Generationswechsel von Neurospora. Sexueller (oben) und asexueller (unten) Fortpflanzungs-Zyklus von Neurospora. Oben: Ascosporen werden in Asci gebildet, die sich in Perithecien befinden. Nach der Keimung bilden die Ascosporen ein Mycelium (coenocytisch, das heißt, viele Kerne im gemeinsamen Cytoplasma). Über Protoperithecien bilden sich Perithecien. In einem Perithecium werden Asci gebildet, womit der sexuelle Fortpflanzungszyklus abgeschlossen ist. Unten: Das Mycel bildet auch asexuell Konidien ('Makrokonidien '): Es bilden sich Luft-Hyphen, die später Konidien produzieren. Sie keimen und bilden neues Mycel (die Musterbildung von Neurospora crassa wurde von Deutsch et al. (1993) beschrieben). Das Umschalten zwischen undifferenziertem Mycel und Luft-Hyphen wird von einer circadianen Uhr bewerkstelligt. Nach Russo and et al (1996). E262/neuropora-entw
molekularbiologisch ist dieser Pilz zugänglich und intensiv bearbeitet. Zahlreiche biochemische Arbeiten wurden an ihm durchgeführt. Die Konidienbildung dient als Zeiger der circadianen Uhr und ist sehr einfach zu messen. *Neurospora* als Untersuchungsobjekt ist in Perkins (1992) beschrieben.

Einen älteren Übersichtsartikel über die Untersuchungen der circadianen Rhythmen gibt es von Woodward and Sargent (1973) und neuere von Feldman (1982), Feldman (1983), Feldman and Dunlap (1983), Lakin-Thomas et al. (1990), Bell-Pedersen et al. (1996), Rensing (1996), Nakashima and Onai (1996), Loros (1998), Lakin-Thomas (1998).

Die circadian kontrollierten Prozesse sind für die verschiedenen Organismen ganz verschieden und speziell. Dem Mechanismus der circadianen Uhr könnte aber ein gemeinsames Prinzip zugrunde liegen. Wenn man also die Uhr von Neurospora crassa versteht, würde das auch für andere circadiane Kontrollen entscheidende Hinweise geben. Die circadiane Uhr dieses Pilzes ist molekularbiologisch von allen circadianen Systemen am besten untersucht. Vielleicht wird er einmal der erste eukaryontische Organismus sein, an dem die Eingänge zur Uhr, der Mechanismus der Uhr und die Ausgänge von der Uhr zu den kontrollierten Prozessen auf molekularem Niveau vollständig verstanden werden.

## 16.2 Circadiane Rhythmen der Konidienbildung und anderer Vorgänge

Die Konidienbildung wird bei Neurospora crassa circadian kontrolliert. Im täglichen Wechsel von Licht und Dunkelheit werden diese asexuellen Sporen in der späten Nacht und am frühen Morgen gebildet. Während der Konidienbildung wird ein dichteres Mycel gebildet. Es ist stärker verzweigt und Lufthyphen wachsen aus dem Medium heraus. An ihnen bilden sich später die Konidien (Abbildung 16.2). Makroskopisch sind sie als gelbliche Banden leicht zu erkennen. Da das Wachstum trotz Konidienbildung konstant ist<sup>1</sup>, kann man diesen Rhythmus mit einem Zentimeter-Maßstab in Wachstumsröhrchen messen und die Abstände zwischen der Mitte aufeinander folgender Konidienbänder bestimmen (siehe Wachstumsröhrchen in Abbildung 16.3 und einen Videofilm wachsender Neurospora crassa mit Protoplasmaströmung von der Fungal Genetics Stock Center's World Wide Web SiteFungal Genetics Stock Center's World Wide Web site (n.d.)).

Allerdings ist dafür eine besondere Mutante, bd, nötig, die auch in geschlossenen Gefäßen Konidien ausbildet. Sonst würde nämlich durch das sich ansammelnde  $CO_2$  die Konidienbildung unterdrückt werden. Der Stamm bd wächst außerdem etwa 30% langsamer als der Wildtyp<sup>2</sup>. Meistens wird noch eine weitere Mutation eingekreuzt, csp. Bei ihr werden keine Querwände zwischen Konidien und Lufthyphen ausgebildet, sodass die Konidien an den Lufthyphen bleiben. Damit wird verhindert, dass sich die Pilze über Konidien leicht verbreiten und andere Stellen des Wachstumsröhrchens infizieren (oder die Kulturen von Mikrobiologen im gleichen Institut).

Sind die Phasen zweier benachbarter Mycel-Teile voneinander verschieden, bleibt dieser Unterschied auch bei Kontakt erhalten. Offenbar ist der circadiane Oszillator lokal autonom. Das zeigt sich auch beim Übertragen von Mycel-Stücken in Wachstumsröhrchen (Perlmann et al. (1981)). Auch in

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>siehe jedoch Lakin-Thomas et al. (2001): Mit Zeitraffer-Video-Aufnahmen wurde gefunden, das die Band/Interband-Festlegung an der Wachstumsfront nicht fest an die folgende Synchronisation der Konidiosporen-Differenzierung gebunden ist. Das könnte auf zwei circadiane Oszillatoren hindeuten, die diese beiden Ereignisse kontrollieren und beinhaltet auch dass das Wachstum nicht immer konstant ist.

 $<sup>^{2}</sup>$ Möglicherweise ist ein Biotin-enthaltender Carboxylase-Komplex betroffen



way again aerial hyphae

Abbildung 16.2: Konidiosporen von Neurospora crassa keimen (a) und wachsen als Hyphen auf einem Substrat zu einem Mycel aus (b). Nach einiger Zeit werden Lufthyphen produziert, die aus dem Substrat als Konidiophoren heraus wachsen und Konidiosporen bilden (c). Danach wachsen sie wieder mit normalem Mycel auf dem Substrat, bis die nächsten Konidienbänder gebildet werden (d). Nach Rensing (1993). E263/konidien-neuro altem Mycel gibt es einen circadianen Rhythmus (Dharmananda (1980)).

Bei konstanter Temperatur und in physiologischer Dunkelheit (schwaches Rotlicht) beträgt die Freilaufperiode 21 bis 22 h. Der Rhythmus ist zwischen  $18^0$  und  $30^0$ C Temperaturkompensiert. Er lässt sich durch Lichtpulse in seiner Phase verschieben.

Die Konidienbildung von Neurospora lässt sich für Experimente in Kursen und in Schulen verwenden (Engelmann and Klemke (1983) und Deutsch (1993)). Siehe auch Engelmann (1999) unter 'Experimente in Schulen (das Buch steht im Internet zur Verfügung: homepage http://bioclox.bot.biologie.uni-tuebingen.de).

Die Konidienbildung ist mit dem circadianen Oszillator eng gekoppelt, aber dieser läuft auch ohne Konidienrhythmus. Zeiger können dann beispielsweise biochemische Rhythmen wie Nukleinsäuremenge und -synthese, Proteingehalt, Enzymaktivitäten (Hochberg and Sargent (1974)), das Verhältnis von ADP zu ATP in den Mitochondrien (Energie-Charge  $(ATP + 1/2ADP) / \sum (ATP + ADP + AMP)$ , Delmer and Brody (1975), Schulz et al. (1985)) sein. Einige Fettsäuren der Membranen schwanken tagesperiodisch (siehe Seite 379).

Andere mit Differenzierungsvorgängen zusammenhängende Vorgänge werden circadian kontrolliert. Die Signale, die diese Stoffwechselvorgänge und Differenzierungsvorgänge kontrollieren, sind noch nicht bekannt. Ein solches Signal könnte cAMP sein, das circadian schwankt (Hasunuma et al. (1987)). Die circadiane Uhr von *Neurospora* kann auch in Einzelzellen beobachtet werden (frisch gekeimte Konidiosporen) (Lindgren (1997)).

#### 16.2.1 Flüssigkulturen

Für biochemische Studien circadianer Rhythmen werden große Mengen Mycelium aus verschiedenen Phasen benötigt. Es ist ungünstig, Teile des Myceliums vom Agarmedium in Schalen zu ernten. Zum Glück besitzen Flüssigkulturen von Neurospora crassa ebenfalls circadiane Rhythmen (Perlmann et al. (1981)). Diese Kulturen lassen sich sehr gut für biochemische Arbeiten verwenden. Eine Panthothensäure-Mangelmutante wurde zunächst mit Panthothensäure angezogen, bis sich auf der Oberfläche Mycelmatten gebildet hatten. Von diesen wurden mit einem Korkbohrer kreisförmige Stücke ausgestanzt und in Flüssigkultur ohne Panthothensäure übertragen, weshalb kein Wachstum stattfand. Trotzdem verlief der circadiane Rhythmus weiter: Wird das Mycelstück auf den Agar eines Wachstumsröhrchens mit Panthothensäure übertragen, gibt es circadiane Bänderbildung (Abbildung 16.3). Die Phasen unterscheiden sich, wenn die Übertragung zu verschiedenen Zeiten des circadianen Zyklus stattfinden. In der Flüssigkultur ohne Panthothensäure kann die Wirkung von Hemmstoffen auf den Rhythmus untersucht werden, ohne befürchten zu müssen, dass der Effekt durch eine Wachstumshemmung zustande kommt (da das Wachstum gestoppt ist, siehe Lakin-Thomas et al. (1990)).

Die circadiane Uhr von *Neurospora* kann auch in einzelnen Zellen (frisch gekeimte Konidiosporen) beobachtet werden (Lindgren (1997)).

## 16.3 Wie Licht auf die Konidienbildung wirkt

Die wichtigsten Umweltfaktoren, die auf circadiane Rhythmen wirken können, sind Licht und Temperatur. Beide wurden intensiv bei *Neurospora crassa* untersucht. Normalerweise ist der Licht-Dunkel-Wechsel der wichtigste Zeitgeber zum Synchronisieren circadianer Rhythmen. Bei *Neurospora* zeigte sich jedoch, dass Temperaturzyklen wichtiger sind und den synchronisierenden Effekt des Licht-Dunkel-Zyklus überspielt, wenn beide Zyklen-Arten gleichzeitig gegeben werden (Liu et al. (1998)).

Wie Licht den circadianen Rhythmus von Neurospora crassa beeinflusst, wurde in einer älteren Zusammenfassung von Sargent and Briggs (1967) dargestellt. Eine etwas neuere Übersicht geben Feldman and Dunlap (1983), Rensing and Schill (1987), Fritz et al. (1990a), Lakin-Thomas et al. (1990) und Linden et al. (1997). Im Zusammenhang mit anderen Systemen werden Lichtwirkungen von Ninnemann (1979) und Edmunds (1988) besprochen. In Kallies et al. (1996) ist der neueste Stand diskutiert. Wie Licht auf molekularer Ebene in Neurospora crassa wirkt, wurde von Crosthwaite et al. (1995) untersucht. Die Ergebnisse sind in Dunlap et al. (1998) zusammenfassend dargestellt. Die Lichteffekte wurde kürzlich auch im Hinblick auf die molekularen Grundlagen des Uhr-Mechanismus modelliert (Ruoff et al. (2001)).

Lichtpulse: Lichtpulse verschieben den circadianen Rhythmus der Konidienbildung von Neurospora crassa (Sargent et al. (1966)). Versuche mit zwei hintereinander gegebenen kurzen Lichtpulsen zeigen, dass bereits nach 45 Minuten der circadiane Oszillator verschoben ist (Dharmananda (1980)). Die Richtung und Stärke der Verschiebung hängt davon ab, wann innerhalb des Zyklus der Lichtpuls gegeben wird. Eine Phasenresponsekurve auf Lichtpulse zeigt diese Verschiebung (Abbildung 16.4), Sargent and Briggs (1967), Dharmananda (1980)). Je nach der Stärke des Lichtpulses gibt es starke und schwache Phasenresponsekurven (siehe Abbildung 14.5 für ein Beispiel von Drosophila). Nach dem Lichtpuls ist der Rhythmus sofort Phasen-verschoben. Es gibt kein Übergangsverhalten, bei dem der Rhythmus erst nach einigen Zyklen endgültig verschoben ist (und wie es bei vielen anderen circadia-



starts to grow and to form conidial bands

Abbildung 16.3: Circadiane Rhythmen laufen auch in Flüssigkulturen von Neurospora crassa ab. Eine Panthothensäure-Mangelmutante wurde zunächst mit Panthothensäure angezogen, bis sich auf der Oberfläche Mycelmatten gebildet hatten (oben links). Von diesen wurden mit einem Korkbohrer kreisförmige Stücke ausgestanzt und in Flüssigkultur ohne Panthothensäure übertragen (oben rechts). Deshalb findet kein Wachstum statt. Trotzdem verläuft der circadiane Rhythmus weiter: Auf Agar eines Wachstumsröhrchens mit Panthothensäure bilden sich circadian Bänder (unten). E265/fluessigkultur

nen Rhythmen anderer Organismen beobachtet wird)<sup>3</sup>.

Wie lange dauert es, bis der Oszillator durch einen Lichtpuls verschoben ist? Dazu wurden Versuche mit zwei aufeinander folgenden kurzen Lichtpulsen durchgeführt und die Zeit zwischen ihnen variiert. Wenn der erste Puls die Uhr verschoben hat, sollte die phasenverschiebende Wirkung des zweiten Pulses auf Grund der Phasenresponsekurve des ersten Pulses voraussagbar sein. Dharmananda (1980) zeigte mit dieser Methode, dass nach 60 Minuten der circadiane Oszillator verschoben war. Wurde der zweite Puls früher gegeben, wurde eine biphasische Reaktion beobachtet. Dieses nichttriviale Ergebnis konnte von Ruoff et al. (2001) simuliert werden, wobei verschiedene Zustände des Lichtsignal-Transduktionsweges angenommen wurden.

Die Größe der Phasenverschiebung hängt von der Umgebungstemperatur ab: Bei höherer Temperatur sind die Verschiebungen durch Licht kleiner.

DES als ATPase-Hemmstoff des Plasmalemmas verhindert die Phasenverschiebung durch Lichtpulse. Venturicin und Oligomycin wirken nicht: Sie hemmen nur die mitochondrialen ATPasen. Azid hemmt sowohl die Plasmalemma- als auch die mitochondriale ATPase und unterbindet die Phasenverschiebung durch Licht.

Licht-Dunkel-Wechsel: Neurospora crassa lässt sich im 12:12h Licht-Dunkel-Wechsel synchronisieren. Kurz vor Licht-an ist gerade die Mitte der Konidienbänder gebildet worden (Abbildung 16.5). Es genügen schon einmal täglich 5 Minuten Licht zur Synchronisation.

Der Mitnahmebereich kann bestimmt werden, indem Licht-Dunkel-Zyklen gegeben werden, die kürzer oder länger als 24 Stunden sind (zum

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Die Phasenverschiebungen durch Licht können durch DES, einem ATPase-Hemmer am Plasmalemma, unterbunden werden. Venturicin und Oligomycin, die mitochondriale ATPase hemmen, haben keinen Effekt. Azid hemmt sowohl Plasmalemma- als auch Mitochondrien-ATPase und verhindert Phasenverschiebung durch Licht.



Sargent and Briggs1967 | E266KN | 19.12.2001

Abbildung 16.4: Phasenresponskurve der rhythmischen Konidienbildung von Neurospora auf einen 45 Minuten langen Lichtpuls (LP). Experimente wie im oberen Bild dargestellt zeigen die Phasenverschiebung der circadianen Konidienbildung durch Lichtpulse. Je nach dem Zeitpunkt im Zyklus (wie durch die schräge Doppellinie im unteren Teil der Abbildung markiert und an der y-Achse angegeben), unterscheiden sich die Zentren der Konidienbänder (rote Punkte, durch schwarze Kurven angepasst) von den unbehandelten Kontrollen (deren Zentren der Konidienbänder durch die dünnen senkrechten Linien durch 24, 48, 72 und 96 Stunden wiedergegeben sind). Phasen-Verfrühungen (Zentren der Banden früher als die der Kontrollen, oberer Teil des Diagramms) und -Verzögerungen (Zentren der Banden später als die der Kontrollen, unterer Teil des Diagramms) werden gefunden, und ein Phasensprung von starker Verzögerung zu starker Verfrühung liegt bei 7 Uhr. Erste, zweite, dritte und vierte Bande sind gezeigt. Da die Periodenlänge etwa 22 Stunden beträgt, wurde die Zeit auf der x-Achse in subjektiver Zeit (24, 48, 72, 96 Stunden statt 22, 44, 66, 88 Stunden Echtzeit) gegeben. Nach Sargent and Briggs (1967). E266v+E266Kn/prc-neurospora Beispiel 11:11, 13:13 Stunden Licht-Dunkel). Er ist ziemlich groß und hängt, wie zu erwarten, von der Lichtintensität ab (Laufer-Lutum et al. (1992)).



Abbildung 16.5: Konidiosporen von Neurospora crassa wurden auf einem Agarmedium inokuliert und begannen von dieser Stelle aus zunächst im Dauerdunkel zu keimen. Synchronisation des circadianen Rhythmus der Konidienbänder-Bildung durch danach gegebenen 12:12h Licht-Dunkel-Wechsel. Kurz vor Licht-an beginnt die Bildung der Konidienbänder und ist einige Stunden danach abgeschlossen. E267/syn-neuro

**Dauerlicht:** Im Dauerlicht werden die Konidien nicht mehr rhythmisch gebildet. Deshalb gibt es dann auch keine Banden (Abbildung 16.6). Lichtintensitäten von  $4.2 erg/cm^2 sec$  wirken bereits. Wahrscheinlich verhindert das Dauerlicht die rhythmische Konidienbildung, ohne den Oszillator zu stoppen (Paietta and Sargent (1983)). Bei *poky*, einer Mitochondrien-Mutante, wird für diesen Effekt 23000  $erg/cm^2 sec$  benötigt und bei einem *poky* Albino genügen bereits 210  $erg/cm^2 sec$ . Wird das gleiche Pigment benutzt, um den Rhythmus im Dauerlicht zu unterdrücken und um die Phase durch einen einzelnen Lichtpuls zu verschieben? Paietta and Sargent (1983) haben Mutanten selektiert, die auch im Dauerlicht noch circadiane Konidienbildung zeigen. Obwohl der Rhythmus ihrer Konidienbildung weniger auf Dauerlicht empfindlich ist, sind Phasenverschiebung, Synchronisation und Carotinoid-Synthese normal. Das spricht dafür, dass die rhythmische Konidienbildung über einen besonderen Photorezeptor unterdrückt wird. Oder aber die Signale werden auf verschiedenen Wegen übertragen. Blind für alle Lichtwirkungen scheinen die *wc* Mutanten zu sein (Russo (1988), siehe jedoch Horwitz et al. (1987)).

**Photorezeptoren:** Licht wird durch Photorezeptoren perzipiert. Ein intrazelluläres Signal wird erzeugt und auf die circadiane Uhr übertragen. Dort beeinflusst es die Größe oder die Aktivität einer Zustandsvariablen des Oszillators.<sup>4</sup>

In verschiedenen Organismen werden ganz unterschiedliche Pigmente benutzt, um circadiane Rhythmen zu synchronisieren. Wie bereits erwähnt und für *Drosophila* eingehender beschrieben (Unterabschnitt 14.2.4), wird die circadiane Uhr einer Art normalerweise durch verschiedene Photorezeptoren synchronisiert. Sogar in einem einzelligen Organismus wurden unterschiedliche Photorezeptoren gefunden (Roenneberg and Hastings (1988)). Bei *Neurospora* ist blaues Licht sowohl bei der Phasenverschiebung durch einen einzelnen Lichtpuls als auch bei der dämpfenden Wirkung von Dauerlicht auf den circadianen Rhythmus wirksam (Maximum um 465 nm, Übersicht von Maci-

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Eine Zustandsvariable ist eine essentielle Komponente der Uhr. Es genügt nicht, dass diese Komponente in der Zelle vorhanden ist. Sie muss auch rhythmisch schwanken, damit die Uhr laufen kann.



Abbildung 16.6: Wachstumsröhrchen mit Mycelien von Neurospora wurden aus dem Dunklen für 72 Stunden (gelber Hintergrund) in Dauerlicht verschiedener Intensitäten (auf der y-Achse angegeben) übertragen. Die rhythmische Konidienbildung wird bereits bei Intensitäten von  $4.2 \, erg/cm^2 sec$  unterdrückt. Nach Paietta and Sargent (1983). 268/ll-neurospora

no et al. (1998) und Abbildung 16.7). Auch UV Licht verschiebt, wie weißes Licht, die Phase. Für andere Lichtreaktionen können weitere Pigmente beteiligt sein.



Abbildung 16.7: Aktionsspektrum der rhythmischen Konidienbildung von *Neurospora crassa* (rot) und Absorptionsspektrum von Flavin (grün). Nach Baskin and Iino (1987). 269/aktionsspektrum-neurospora d269A

Carotinoide (Russo (1986))<sup>5</sup> und Nitratreduk-

Die Mutante poky mit geringer Cytochrom-Konzentration zeigt eine schwächere Phasenverschietase, die Flavin enthält, sind nicht an der Licht-Perzeption beteiligt (Ninnemann (1984)). Auch Cryptochrom ist nicht beteiligt, obwohl CRY1 in *Neurospora* vorkommt. Es fungiert aber weder als Photorezeptor für die Carotinbildung noch für die Licht- regulierte Transkription.

Der Blaulicht-Photorezeptor scheint eng mit dem Uhr-Mechanismus verbunden zu sein. Aber er ist wohl kein integraler Teil des circadianen Oszillators von Neurospora: Er kann von der Uhr getrennt werden, indem die Lichteingänge unterbrochen werden (in Mutationen), ohne dass dadurch die circadian Uhr aufhört zu laufen. In welches Signal (Signale?) das Licht nach seiner Perzeption umgewandelt wird und wie diese auf die circadiane Uhr wirken, wird gerade intensiv untersucht (Macino et al. (1998)). Dazu werden Mutanten verwendet, bei denen die Empfindlichkeit auf phasenverschiebendes Licht geändert ist (poky, rib-1, rib-2, wc-1, wc-2). Außerdem wurden Substanzen verwendet, die die Transduktion der Lichtsignale blockieren (Azid, DES, DCCD, Äthanol, Übersicht Lakin-Thomas et al. (1990)).

Von anderen Systemen ist bekannt, dass vier Mechanismen für die Weiterleitung des Lichtsignals benutzt werden:

- 1. Aktivierung der Phospholipase C, IP<sub>3</sub> wird freigesetzt, Ca<sup>2+</sup> mobilisiert und Proteinkinase C aktiviert.
- 2. cAMP- und/oder cGMP-Aktivitäten werden beeinflusst
- 3. die Proteinkinase-Aktivität des Rezeptors wird moduliert
- 4. Ionenkanäle werden moduliert.

bung durch Lichtpulse. Der Oszillator ist jedoch nicht beeinflusst, sondern nur der Übertragungsweg des Lichtsignals (Schulz et al. 1985). Im starken Blaulicht werden die Photorezeptoren irreversibel gebleicht (Munoz et al 1975).

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Das zeigen Versuche mit einer Mutante, in denen drei Albino-Mutationen al-1, al-2 und al-3 kombiniert sind. Der Carotinoidgehalt war bei den Mutanten geringer als 0.5% des Wildtyps (Russo (1986)). Auch die poky-Mutante reagiert weniger stark auf Licht. Sie bildet kein Cytochrom (Brain et al. (1977), Schulz et al. (1985)). Auch Riboflavin-Mangelmutanten (rib) zeigen eine verringerte Reaktion auf Licht (Paietta and Sargent (1981)). Absorptionsspektren sprechen ebenfalls für eine Reduktion eines Cytochrom b durch Flavin. Allerdings könnten Cytochrome verschiedener Herkunft (Plasmalemma, Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum) verschiedene Rollen spielen. Das Cytochrom im Plasmalemma könnte für den Einfluss des Lichtes auf den Rhythmus verantwortlich sein (Borgeson and X (1985)). Licht-blinde Stämme wc-1 und wc-2 lassen sich noch synchronisieren. Die Induktion des frq durch Licht wird jedoch bei dieser Mutante unterbunden (Loros (1995)). Starklicht bleicht die Photorezeptoren irreversibel (Munoz et al. (1974)).

Wahrscheinlich trifft Mechanismus 3 für Neurospora zu. Blaulicht aktiviert WC-1 sehr rasch durch Phosphorylierung über eine Proteinkinase C, einem Licht-spezifischen, positiv wirkenden Element. WC-1 ist somit das Substrat für die Proteinkinase C (Macino et al. (1998)). Es ist möglich, dass auf diese Weise das FRQ Protein phosphoryliert wird. Es enthält drei funktionell wichtige Phosphorylierungsstellen für Phosphokinasen. Die Kinasen sind redundant, aber die meisten von ihnen hängen von Calcium/Calmodulin ab (Yang et al. (2001)). Auch das PER Protein von Drosophila zeigt circadiane Schwankungen in der Phosphorylierung. Die Doppelmutante white color wc-1 und wc-2 ist blind (Russo (1988)). Die Rolle von WC bei der Synchronisation und Phasenverschiebung des circadianen Oszillators von Neurospora durch Licht wird im Zusammenhang mit dem molekularen Mechanismus in Abschnitt 16.8 behandelt.

## 16.4 Temperatur-Wirkungen, Temperatur-Kompensation

Wie Lichtpulse können auch Temperatur-Pulse den circadianen Rhythmus von *Neurospora crassa* verschieben. Temperaturzyklen wirken bei *Neurospora* sogar stärker als Licht-Dunkel-Zyklen (Liu et al. (1998)). Je nach der Stärke und Dauer gibt es starke und schwache Reaktionen. Diese Effekte finden sich bei Kulturen auf Agar und bei Flüssigkulturen. Hitzepulse wirken stärker als Kältepulse. Bereits 2<sup>0</sup> Unterschiede im 24 Stunden Takt gegeben synchronisieren den Rhythmus von *Neurospora crassa* (Francis and Sargent (1979)).

Damit eine circadiane Uhr richtig funktioniert, darf sie bei unterschiedlichen Umgebungs-Temperaturen nicht verschieden schnell gehen. Zwar ist es nahe liegend, dass eine circadiane Uhr nicht stark von der Umgebungstemperatur abhängig sein darf, aber diese Annahme wurde nie getestet. Temperaturkompensation könnte auch nur ein Nebeneffekt sein, beispielsweise durch den Mechanismus der Uhr bedingt und ohne adaptive Bedeutung. So haben auch homöotherme Tiere eine Temperatur-kompensierte circadiane Uhr (Gibbs (1981)). Andererseits gibt es auch 'circadiane' Rhythmen mit geringer (*Phaseolus*, Mayer (1966)) oder fehlender Temperaturkompensation (*Thalassomyxa australis*, Silyn-Roberts et al. (1986)).

Die circadiane Konidienbildung ist bei Neurospora crassa nur zwischen  $18^0$  und  $30^0$ Temperatur-kompensiert ( $Q_{10} = 0.95$ )) (Abbildung 16.8, Gardner and Feldman (1981)). Auch bei anderen Organismen funktioniert die Temperaturkompensation der circadianen Uhr nur innerhalb gewisser Grenzen. Außerhalb dieser 'erlaubten Temperatur' hört die Temperaturkompensation auf oder die circadiane Uhr stoppt und bleibt in einer bestimmten Phase

Bei höheren Temperaturen beträgt der  $Q_{10}$  1.3. Dann ist die Periode auch Medien-abhängig. Die Mutanten frq 1, 2, 4 und 6 mit Periodenlängen kürzer als beim Wildtyp haben ebenfalls bei 30<sup>0</sup>C diesen 'breakpoint'. Bei den Mutanten frq 3, 7 und 8 mit längeren Perioden als beim Wildtyp liegt der breakpoint niedriger und die Perioden von frq 7 und 8 sind über  $22^{0}$ C nicht Temperatur-kompensiert. Die lange Periode ist aber nicht allein für den Verlust der Temperaturkompensation verantwortlich, da bei der Mutante chr (ein anderes Gen als frq) mit langer Periode die Temperaturkompensation auch über  $30^0$  zu finden ist und bei *prd* 3 der  $Q_{10}$ für Temperaturen unter  $30^{0}$ C kleiner als 1 ist. prd 4 mit kurzer Periode besitzt mehrere breakpoints. Schließlich besitzt  $chr^*prd$  unter 27<sup>o</sup>C einen ungewöhnlich niedrigen  $Q_{10}$  von 0.86.

Völlig verloren gegangen ist die Temperaturkompensation bei frq 9. Der  $Q_{10}$  beträgt zwischen  $18^0$ und  $30^0$ C und ist damit mit 2.0 genauso hoch wie der der Wachstumsrate (Loros and Feldman



Abbildung 16.8: Die circadiane Konidienbildung von Neurospora crassa ist zwischen  $18^0$ und  $30^0$  Temperatur-kompensiert (rote Kurve, rechte y-Achse), während die Wachstumsrate stark von der Temperatur abhängt (grüne Kurve, linke y-Achse). Nach (Gardner and Feldman (1981)). E270/temp-comp-neurospora

1986). Der Rhythmus ist aber nicht einfach an die Wachstumsrate gekoppelt, da die Periodenlänge von der Zusammensetzung des Wachstumsmediums anders abhängt als die Wachstumsrate. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass der *frq*-Locus direkt für die Temperaturkompensation verantwortlich ist. Andererseits ist die Temperaturkompensation bei *Neurospora crassa* nicht unbedingt für das Zustandekommen des Rhythmus nötig.

Die *cel* Mutante hat die Temperaturkompensation ihres circadianen Rhythmus unterhalb von  $22^{0}$ C verloren (Mattern et al. (1982)). *cel* hat einen defekten Fettsäure-Synthetase-Komplex. Werden Fettsäuren zugegeben, zum Beispiel Palmitinsäure 16:0, wächst *cel* normal und die Periodenlängen sind wieder Temperatur-kompensiert. Membranen scheinen also am circadianen Rhythmus von *Neurospora crassa* beteiligt zu sein und die Homöostase der Membran-Fluidität ist möglicherweise für die Temperaturkompensation verantwortlich (siehe jedoch die Diskussion unten und Abbildung 16.15).

Bei Heterokaryons (Fusionen verschiedener Kerne

in einer Zelle) sind die Periodenlängen intermediär.

Verschiedene Modelle wurden aufgestellt, um die Temperatur-Kompensation zu erklären (Ruoff et al. (1997), Engelmann and Schrempf (1979)):



Abbildung 16.9: Modell zur Temperaturkompensation der circadianen Konidienbildung bei *Neurospora crassa* durch zwei gegenläufige Reaktionen, die beide in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur abhängen. Da das Enzym E1 (A  $\Rightarrow$ B) durch D gehemmt wird, bleibt die Periode konstant. Nach Dunlap and Feldman (1988), basierend auf einen Vorschlag von Hastings and Sweeney (1957). 271/t-kompneuro

1. Nach Dunlap and Feldman (1988) verläuft die Reaktion von  $A \Rightarrow B$  bei hoher Temperatur schneller. Der Vorgang wird aber vom Produkt einer zweiten Reaktion  $C \Rightarrow D$  gehemmt, und diese Hemmung ist bei höherer Temperatur stärker. Bei Temperaturen über  $30^{0}$ C reicht die Hemmung nicht mehr aus, deshalb ist die Temperatur-Kompensation nicht mehr gewährleistet. Bei frq 1 ist der Vorgang  $C \Rightarrow D$  beschleunigt. Dadurch wird mehr D gebildet und die Temperatur-Kompensation wird beeinträchtigt (Abbildung 16.9). Bei  $30^{\circ}$ C geht die Temperaturkompensation verloren, da dann die Rate der Hemmung durch D nicht mehr erhöht werden kann. Die Geschwindigkeiten kritischer Reaktionen müssen sich also für eine Temperatur-Kompensation innerhalb bestimmter Grenzen befinden. Wenn Mutationen diese Reaktionsgeschwindigkeiten betreffen, führt das zu veränderten Temperatur-Abhängigkeiten. Bei frq 7 wird möglicherweise  $E_2$  überexprimiert oder es ist stabiler. Dadurch ist bei allen Temperaturen mehr  $D_2$  vorhanden, die Reaktion A  $\Rightarrow$ B bei allen Temperaturen gehemmt und dadurch verlangsamt. Die Periodenlänge ist also größer und die Temperaturkompensation beeinflusst, wie das für diese Mutante bekannt ist.

- 2. Das biochemische Oszillatormodell von Pavlidis and Kauzman (1969) beruht auf Aktivierung und Inaktivierung eines Enzyms. Temperaturkompensation benötigt Temperatur-unabhängige Quotienten der Reaktionskonstanten. Bestimmte Reaktionskonstanten sind durch Diffusion kontrolliert und deshalb Temperaturunabhängig. Das Produkt von Reaktionskonstanten und Gleichgewichtskonzentration eines Enzyms muss Temperaturunabhängig sein. Der Mechanismus dieser Temperaturkompensation beruht offenbar auf einer Temperatur-induzierten Konformationsänderung von Proteinen (Somero (1996)).
- 3. Nach einem anderen Modell ist die Fettsäure-Zusammensetzung der Membran für die Temperaturkompensation verantwortlich (Cote and Brody (1987)). Die *cel* Mutante mit geänderter Fettsäure-Zusammensetzung der Membranen hat die Temperaturkompensation des circadianen Rhythmus verloren, wie schon erwähnt.

Für Einzelheiten siehe Lakin-Thomas et al. (1997) und Lakin-Thomas (1998).

- 4. Ein antagonistisches Gleichgewicht chemischer Oszillatoren ergibt nach Ruoff (zusammengefasst in Ruoff et al. (1997)) Temperaturkompensation, weil Periodenverlängernde und Perioden-verkürzende Reaktionen zusammenwirken. Wird das Oszillatormodell von Goodwin (1965) mit negativer Rückkopplung zu Grunde gelegt, werden Phasen-Antworten auf Temperaturstufen und Temperaturpulse und Temperaturkompensation korrekt vorausgesagt. Die abbauenden Reaktionen beeinflussen die Periodenlänge, die Reaktionskonstanten der Synthese aber nicht. Die Proteine, mRNA und Transkriptionshemmer der Uhr werden richtig simuliert (siehe Abbildung 16.14 und 16.21)
- 5. Eine weitere Erklärung für die Temperaturkompensation ergibt sich aus einem Modell von Lakin-Thomas et al. (1991) für den circadianen Rhythmus von Neurospora crassa. Dabei spielt die Amplitude der Oszillation eine wichtige Rolle. Es wurde beobachtet, dass Mutanten mit verlängerter Periode weniger stark auf Lichtpulse und Cycloheximid-Pulse reagieren als der Wildtyp. Die Autoren erklären das über die Amplitude der Oszillation. Ist diese größer, können durch den gleichen Störpuls nur noch geringe Phasen-Reaktionen erzielt werden. Die Temperaturkompensation lässt sich mit diesem Modell ebenfalls erklären: Mit steigender Temperatur erhöht sich die Amplitude, sodass durch den längeren Weg auf dem Grenzzyklus die Periode sich nur wenig ändert, obwohl der Prozess schneller abläuft (Abbildung 16.10).
- 6. Neuere Befunde molekularbiologischer Untersuchungen haben zu einer weiteren

Hypothese geführt, die die Temperaturkompensation der circadianen Uhr von *Neurospora crassa* erklären kann (Liu et al. (1997), siehe Seite 384).

## 16.5 Wirkung von Substanzen auf circadiane Rhythmen

Im vorigen Abschnitt wurde der relativ geringe Einfluss der Umgebungstemperatur auf die circadiane Uhr von *Neurospora* beschrieben. Circadiane Uhren sind aber auch ziemlich unempfindlich gegenüber Einflüssen des Stoffwechsels und alle möglichen chemischen Verbindungen. Das gilt auch für *Neurospora*, obwohl vielleicht zu einem geringeren Ausmaß als andere Organismen, bei denen solche Einflüsse auf die circadiane Uhr untersucht wurden. Einige Beispiele werden im folgenden gegeben.

Das Nährmedium beeinflusst die Periodenlänge in der Regel nur wenig. Mit Azetat, Casaminosäuren und Vogel'scher Salzlösung sind die Banden schärfer ausgeprägt. Verschiedene Aminosäuren wie Arginin, Tryptophan, Histidin und Alanin beeinflussen den Rhythmus, andere (Lysin, Cystein, Glycin, Methionin, Thyrosin) nicht. Manche Aminosäuren stimulieren die Konidienbildung und der Rhythmus hält länger an. Die Nährmedien beeinflussen nur den Zeiger der Uhr, nicht die Uhr selbst. Langsam wachsende Stämme zeigen den Rhythmus besser.

Werden Hyphen auf neues Medium übertragen, sind sie mit dem Mutter-Mycel in Phase. Auf altem Medium ist der Rhythmus etwas verlangsamt. Auch wenn der Konidien-Rhythmus sich nicht zeigen kann (wenn zum Beispiel das Medium sehr dicht besät wird), ist der Rhythmus noch vorhanden, wie man durch Übertragen zeigen kann.

Der extrazelluläre pH im Bereich von 4-9 be-

einflusst die Periodenlänge des Sporulations-Rhythmus kaum, obwohl die Wachstumsrate dadurch stark beeinflusst wird (Ruoff et al. (2000a)).

 $CO_2$  dämpft den Rhythmus der Konidienbildung (Sargent and Kaltenborn (1972)). Das zeigt sich besonders beim Wildtyp. Durch Belüften bilden sich auch bei diesem die Konidien rhythmisch. Wenn die Biotin-Konzentration im Medium gering ist, zeigt auch der Wildtyp einen guten Rhythmus der Konidienbildung. Biotin ist Cofaktor zweier Enzyme, die an der Dunkelfixierung von  $CO_2$  beteiligt sind.

Zucker haben nur geringe Wirkung auf den Rhythmus.

Alkohole, Detergentien und Ionophoren wie Valinomycin (Frelinger et al. (1976)) beeinflussen den circadianen Rhythmus.

Beeinflussungen durch Inhibitoren sind in Abschnitt 16.6 erwähnt.

## 16.6 Wie lässt sich der Mechanismus der circadianen Uhr von *Neurospora* aufklären?

Wie circadiane Rhythmen funktionieren, ist auch bei *Neurospora* noch nicht aufgeklärt. Wie schon früher erwähnt, eignet sich *Neurospora* aber besonders gut dazu, den zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären.

Es ist schwierig, in einem komplexen Regelsystem Teile so lahm zu legen, dass nicht das gesamte System mit beeinflusst wird. Zum Glück scheint der Uhr-Mechanismus diskret zu sein, da Mutanten mit Defekten in der Aminosäure-Synthese, gewisse Aspekte der Lipid-Synthese, der Vitamin-Synthese und einigen anderen Stoffwechselwegen *nicht* für die Uhr wesentlich sind. Auch Hemmstoffe bestimmter Stoff-



Abbildung 16.10: Temperaturkompensation durch Amplitudenänderung eines Zeit-verzögerten Oszillators. Oben: Änderungen der Zustandsvariablen x hängen davon ab , wie x sich D Zeiteinheiten früher verhielt. Periodenlänge und Amplitud sind für verschiedene D-Werte dargestellt (4.2 bis 5.4). Links unten: Für zwei verschiedene D-Werte (4.4 und 5.4) sind die Phasendiagramme (dx/dt versus x) gezeigt. Mit zunehmender Temperatur nimmt die Amplitude zu. Dadurch wird der Weg auf dem Grenzzyklus größer (roter Grenzzyklus im unteren linken Diagramm), aber der Vorgang verläuft auch schnaller: Als Folge davon ändert sich die Periode nicht wesentlich. Unten rechts: Oszillation von x (y-Achse) mit der Zeit (x-Achse) für zwei extreme Werte von D (4.4, blaue, und 5.4, rote Kurve). Für weniger extreme D Werte sind die Periodenlängen bei verschiedenen Temperaturen ziemlich ähnlich. Nach Lakin-Thomas et al. (1991). E272/ampl-modell-neuro

wechselwege beeinflussen die circadiane Uhr nicht. Obwohl das circadiane System viele Stoffwechsel-Parameter beeinflusst, ist es vor Änderungen des Stoffwechsels gut geschützt (Roenneberg and Merrow (1999)). Im folgenden werden einige Ergebnisse vorgestellt, die mit Zugabe von Substanzen, Hemmstoffen und unter Verwendung von Mutanten erzielt wurden.



Abbildung 16.11: Ungesättigte Fettsäuren wie Oleat, Linolenat und Linoleat (Konzentration auf der x-Achse) verlängern die Periode des Konidienrhythmus bei der Mutante cel von *Neurospora crassa* bis zu einer oberen Grenze (rote Kurve). Die Periodenlänge kann wieder normalisiert werden, indem eine gesättigte Fettsäure (16:0) dem Medium zugegeben wird (schwarze Kurve). Nach Brody and Martins (1979b). 275/fettsaeuren-neuro

#### Pharmakologisches Vorgehen:

Substanzen oder Inhibitoren, die mit bestimmten Teilen des Stoffwechsels interferieren, werden zugegeben. Es wird geprüft, ob die circadiane Uhr beeinflusst wird, indem sich ihre Periode ändert oder sie nicht mehr läuft. Pulse dieser Substanzen können die Phase des Rhythmus verschieben. In einer Reihe von Untersuchungen wurden bestimmte Substanzen *Neurospora* angeboten und die Wirkungen beobachtet:

Nystatin- (und Valinomycin-) Pulse verschieben den Rhythmus in seiner Phase. Nystatin beeinflusst Membranen über Membran-Steroide wie Ergosterol. Dadurch geht  $K^+$  verloren und die Membranen depolarisieren.

Ungesättigte Fettsäuren wie Oleat, Linolenat und Linoleat verlängern die Periode des Konidienrhythmus bei der Mutante  $cel^-$  (Abbildung 16.11). Die Perioden-Verlängerung kann rückgängig gemacht werden, indem gesättigte Fettsäuren (16:0) zum Medium gegeben werden (Abbildung 16.11, Brody and Martins (1979b)). Der Perioden-verlängernde Effekt hängt von der Temperatur ab. Bei  $30^0$  ist er kaum vorhanden, bei  $20^0$  maximal und bei  $25^0$  intermediär. Diese Fettsäuren beeinflussen auch die Temperatur-Kompensation.

Gesättigte Fettsäuren verlängern die Periode nach einigen Tagen (Brody and Martins (1979a)).

Zugabe von Hemmstoffen ist eine andere Proteinsynthese-Hemmstoffe Strategie. wie Cycloheximid verschieben ebenfalls die Phase des Konidienrhythmus. Cycloheximid hemmt die 80s Proteinsynthese. Werden Cycloheximid-resistente Mutanten mit Cycloheximid behandelt, wird die Phase nicht verschoben. Mutanten mit langen Perioden sind auf Cycloheximid unempfindlich. Möglicherweise sind Temperatur-Kompensation und Proteinsynthese miteinander verknüpft. Mutanten mit langen Perioden besitzen vielleicht eine höhere Protein-Konzentration. Chloramphenicol hemmt die Proteinsynthese an den 70s Ribosomen. Es verkürzt die Periode des Konidienrhythmus (Frelinger

et al. (1976)). Da aber die l- und die d-Form wirken, während bei der Proteinsynthese nur die d-Form hemmt, dürfte es sich um einen anderen Effekt handeln.

Phosphodiesterase-Inhibitoren verlängern die Periode der circadianen Konidienbildung. Dieser Hemmstoff erhöht die cAMP Konzentration. Allerdings hesitzt die Mutante crisp mit niedriger Adenylatcyclase (die cAMP abbaut) eine normale Periodenlänge und lässt sich durch einen Licht-Dunkel-Wechsel Quinidin, synchronisieren. Auch ein Adenylatcyclase-Hemmstoff, hat keinen Effekt.

Genetisches Vorgehen: Generell können Mutanten in unterschiedlicher Weise dazu beitragen, Licht auf den Mechanismus circadianer Rhythmen zu werfen. Bekannte biochemische Mutanten können zum Beispiel untersucht werden, um herauszufinden, ob bei ihnen der Rhythmus geändert ist. Wenn das nicht der Fall ist, ist der betroffene Stoffwechselweg für die Uhr nicht essentiell. Außerdem können Mutanten benutzt werden, die Eigenschaften der Uhr ändern. Man kann versuchen, die zugrunde liegenden Mechanismen herauszufinden, die in der betreffenden Mutante anders sind als im Wildtyp. Sie müssen eine direkte oder indirekte Rolle im Uhr-Mechanismus spielen.

> Mutanten mit Defekten in biochemischen Wegen wurden verwendet, um zu testen, ob diese am circadianen Rhythmus beteiligt sind. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass bei *Neurospora crassa* der Glyoxalat-, Krebs- und Harnstoff-Zyklus dafür nicht wichtig sind.

> Resistente Mutanten wurden isoliert, um ihren Einfluss auf circadiane Rhythmen zu untersuchen. Experimente mit

der Oligomycin-resistenten Mutante  $oli^r$ zeigten, dass sie bei  $22^0$  eine kürzere Periode hat als der Wildtyp. Zwischen  $26^0$ und  $30^0$  fehlt aber dieser Effekt. Da bei dieser Mutante die mitochondriale ATP-Synthetase betroffen ist, könnte die ATP-Synthese ein Teil der Uhr sein. Andererseits ist ATP auch für die Proteinsynthese und den Ionen-Transport wichtig.

Mutanten mit geänderten Eigenschaften der Uhr wurden ebenfalls benutzt. Zum Beispiel  $cel^-$ , bei der die Temperaturkompensation unterhalb von  $22^0$  fehlt. Palmitinsäure stellt die Kompensation wieder her. Es wurde vermutet, dass Membranen eine wichtige Rolle spielen. Jedoch hat Phenethylalkohol, der die Phospholipid-Zusammensetzung der Membran stark verändert, keinen Effekt auf den circadianen Rhythmus.

Andere Mutanten, die Uhr-Eigenschaften betreffen, sind in Tabelle 16.1 aufgelistet.

Aus solchen und anderen Untersuchungen wurden die folgenden Schlüssen gezogen:

**Membranen:** Membranen spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei circadianen Rhythmen. Die Zeitverzögerung, die nötig sind, damit Oszillationen entstehen, können gut durch Diffusion an Membranen erklärt werden. Njus et al. (1974) benutzt Membranen in seinem Modell für circadianen Rhythmen (siehe auch Sweeney (1974a)). Die Photorezeptoren zum Synchronisieren circadianer Rhythmen sind Membran-gebunden.

Die Struktur und Funktion von Membranen ändert sich circadian. Eine Reihe von Substanzen, die circadiane Rhythmen beeinflussen, wirken auf Membranen. Dazu gehören Fettsäuren, Nystatin, Fusarsäure, Steroide, Filipin, Vanillinsäure, Ionen wie  $Li^+$  und Ca<sup>2+</sup> Abszissinsäure, Valinomycin (ein Ionophor), Detergentien, Hyamin, Digitonin, Alkohole, Morphactine,  $D_2O$ . Vielleicht sind die Mitochondrien-Effekte sekundärer Natur und wirken eigentlich über Membranen. Dafür sprechen Untersuchungen von Nakashima, bei denen die Plasmalemma-ATPasen gehemmt wurden. In diesem Zusammenhang sind Mutanten interessant, bei denen die Membranen verändert sind, wie Fettsäure-Mutanten (siehe auch Temperaturkompensation), osmotische Mutanten, pH empfindliche und resistente Mutanten, Ionen-empfindliche Mutanten und Permeabilitäts-Mutanten.

Außerdem schwanken einige Fettsäuren von Membranen circadian (Linolensäure, und  $180^{\circ}$ dazu phasenverschoben Linoleinsäure). Andere wie Palmitinsäure, Stearinsäure, Oleinsäure ändern sich nicht (Roeder et al. (1977)). Auch im Wildtyp ist das so, obwohl er keinen Rhythmus der Konidienbildung zeigt. Die Schwankungen der Fettsäuren sind demnach nicht das Ergebnis morphologischer Änderungen in den Hyphen während eines circadianen Zyklus. Wird Linolensäure dem Medium von cel Mutanten zugefügt, ändert sich die Periode beträchtlich (von 21 auf 40 Stunden, siehe Abbildung 16.11). Fettsäuren scheinen demnach eine wichtige Rolle beim circadianen Rhythmus von Neurospora zu spielen (Mattern and Brody (1979), Übersicht bei Lakin-Thomas et al. (1990)).

**Proteinsynthese:** Wird die Proteinsynthese zu bestimmten Zeiten des Zyklus durch Chloramphenicol (Frelinger et al. (1976)), Cycloheximid (Nakashima et al. (1981)), Actinomycin, Mitomycin oder Puromycin gehemmt, gibt es Phasen-abhängige Verschiebungen. Allerdings verkürzen mit Chloramphenicol sowohl das rechts- (enthält D(+)Threonin) als auch das links drehende (enthält D(-)Threonin) die Periodenlänge. Da nur das links drehende die Proteinsynthese hemmt, besteht entweder kein Zusammenhang zwischen der Chloramphenicol-Wirkung auf die Periodenlänge und der Proteinsynthese, oder das Protein, was für die Perioden-Verkürzung verantwortlich ist, gehört zu einer besonderen Klasse, die mit dem links drehenden Chloramphenicol hemmbar ist, oder Chloramphenicol wirkt auf die Struktur oder den Elektronentransport von Membranen und hat keine Beziehung zur Proteinsynthese in Mitochondrien. Dafür spricht, dass auch Valinomycin den gleichen Effekt hat wie Chloramphenicol.

Rolle der Mitochondrien: Hemmstoffe und Mutationen, die den Stoffwechsel der Mitochondrien beeinflussen, ändern das circadiane Verhalten von *Neurospora* (Dieckman and Brody (1980), Brody (1992)). Die Mutante *oli* hat defekte Mitochondrien durch eine geänderte Struktur eines mitochondrialen Proteins (ATP-Synthetase?). Diese Mutante zeigt eine andere Periodenlänge des circadianen Rhythmus (18.5h). Andere Mutanten mit höheren Konzentrationen mitochondrialer Proteine zeigen ebenfalls kürzere Perioden.

Calmodulin, Calciumkanäle, Calcium, Phosphatidyl-Inositol-Zyklus: Von verschiedenen Autoren wurde die Rolle des Calciums, Calmodulins, der Calciumkanäle und des Inositol-Zyklus bei der circadianen Konidienbildung von Neurospora crassa untersucht. Das Calcium-Ionophor A23187 verschiebt den Rhythmus Phasen-abhängig.  $Ca^{2+}$  scheint am späten subjektiven Tag für den Rhythmus wichtig zu sein (Nakashima (1985)). Dafür spricht auch, dass Calmodulin-Antagonisten als Puls zu verschiedenen Phasen des Zyklus zu diesen Zeiten den Rhythmus verschieben (Aoki et al. (1997), Nakashima (1986)).  $Ca^{2+}$ -Kanal-Hemmstoffe verschieben den Rhythmus zum Zeitpunkt CT5 um 5 Stunden (Techel et al. (1990)).

Lakin-Thomas (1993) prüfte, ob der IP-Signalweg am Rhythmus der Konidienbildung beteiligt ist. Dafür sprach zunächst, dass Lithium die Periode der rhythmischen Konidienbildung verlängert. Ihre Untersuchungen ergaben jedoch, dass der IP-Signalweg nicht die Lithium-Wirkung hervorbringt. Auch die Phasenverschiebung durch Blaulicht erfolgt nicht über diesen Weg.

## 16.7 Mutationen im circadianen System

Von Neurospora crassa sind inzwischen mehr als 5000 Mutanten bekannt. Bei einigen ist die rhythmische Konidienbildung beeinflusst (Übersicht Lakin-Thomas et al. (1990)). Einige dieser Uhr-Mutanten haben die Temperaturkompensation verloren und in einigen weiteren Fällen ist die Empfindlichkeit gegenüber Licht betroffen (Loros et al. (1986), Loros and Feldman (1986), Gardner and Feldman (1981), Dharmananda (1980)). Bei anderen Mutationen ist die Periodenlänge verändert. Einige dieser Gene sind pleiotrop oder wirken Organismus-spezifisch und damit sind damit ohne Informationsgehalt. Die kanonischen Uhr-Gene sind in Tabelle 16.1 zusammengestellt. Von der frq Mutante 9 sind Allele bekannt. Weitere Mutanten sind bekannt, aber ihr Einfluss auf die circadiane Uhr ist gering. Besonders intensiv wurden die frq Mutanten untersucht. Sie haben schnellere oder langsamere circadiane Uhren als der Wildtyp, aber eine normale Wachstumsrate.

_																							
Referenz	Mattern et al. (1982)	Lakin-Thomas (1996)	Feldman and Hoyle (1976)	Gardner and Feldman (1980), Feldman and Hoyle (1976)	Gardner and Feldman (1980), Feldman and Hoyle (1976), Collett et al. (2001)	Gardner and Feldman (1980), Feldman and Hoyle (1976), Collett et al. (2001)	Loros and Feldman (1986), Loros et al. (1986)	Aronson et al. (1994a)	Nakashima and Onai (1996), Garceau et al. (1997), Liu et al. (1997)	Feldman et al. (1979), Feldman and Atkinson (1978)	Feldman (1982), Feldman et al. (1979), Gardner and Feldman (1980)	Feldman (1982), Feldman et al. (1979), Gardner and Feldman (1980)	Feldman (1982), Feldman et al. (1979), Gardner and Feldman (1980)	Morgan and Feldman (1997)	Heintzen et al. (2000)	Crosthwaite et al. (1997)	Collett et al. (2001)	Onai et al. (1998)	Chang and Nakashima (1998)	Loros et al. (1986)	Goto et al. (1994)	Goto et al. (1994)	
beeinflusst	Temperaturkompensation	Temperaturkompensation			Temperaturkompensation	Temperaturkompensation (TC)	frame shift Mutante, TC, Nutr.komp., entr.	frq Null, TC, Nährstoff-Kompensation	rhythmisch nur unterhalb 27 <sup>0</sup> C	Temperaturkompensation		Temperaturkompensation	Temperaturkompensation	Temperaturempfindlich, epistatisch für prd-2	Phasenmutante, 4 Std früher		Temperaturkompensation				Temperaturempfindlich (TS)	TS, RNA Polymerase I Untereinheit	
Periodenlänge in Std	variabel	23.5	16	19	24	29	konditional, NC	konditional, NC	konditional, NC	26	25.5	25	18	kurz	23	konditional-NC	konditional-NC	lang	konditional	lang	lang, konditional	long, conditional	

Das frq Gen befinden sich auf dem Chromosom IVR (siehe Abbildung 16.13). Für den Rhythmus spielt der Locus oder das Genprodukt eine entscheidende Rolle, denn Wachstum und Entwicklung aller frq Mutanten ist normal. Normalerweise fällt bei einer Mutation ein Merkmal aus. Während die meisten Verlustmutanten rezessiv sind, zeigen die frq Mutanten unvollständige Dominanz. Heterokaryons<sup>6</sup> weisen einen Gendosis-Effekt auf: Zwischen der phänotypischen Periodenlänge und der Gendosis der frq1-Kerne gibt es eine Proportionalität (Abbildung 16.12). All das spricht für eine entscheidende Rolle von frq oder dem frq-Produkt FRQ für den circadianen Rhythmus.



Abbildung 16.12: Heterokaryons (siehe 6) von Neurospora zeigen einen Gendosis-Effekt: Die phänotypische Periodenlänge (y-Achse) und die Gendosis der frq 7-Kerne (x-Achse) sind proportional zueinander. Schwarze Punkte: Wildtyp (links) beziehungsweise frq 7 (rechts). Nach Loros et al. (1986). E273N/heterokaryon

## 16.8 Der Uhr Mechanismus von Neurospora

Wie kontrollieren circadiane Uhren die Genexpression und wie interagieren sie mit der Umwelt? Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten, diese Fragen zu beantworten und Übersichten der genetischen (Feldman et al. (1979), Feldman (1982), Feldman (1983), Feldman and Dunlap (1983)) und molekularbiologischen Untersuchungen (Dunlap (1993), Aronson et al. (1994b), Loros (1995), Liu et al. (1997), Dunlap et al. (1998), Lakin-Thomas (1998), Loros and Dunlap (2001)) sind verfügbar. Der Mechanismus, der diesen circadianen Rhythmen zugrunde liegen soll, wird im folgenden besprochen. Er ist ziemlich kompliziert. Beim Neurospora-System interagieren circadiane Kontrolle, Kontrolle durch Licht, Stoffwechsel-Kontrollen und Kontrollen der Entwicklung miteinander.

Hier sollen die circadiane Kontrolle, die Kontrolle durch Licht und die Funktion auf molekularer Ebene besprochen werden. Zunächst werden wir die Spieler kennen lernen, dann das Spiel (die Interaktionen zwischen den Spielern), und schließlich die Regeln und Ziele des Spiels.

#### 16.8.1 Die Spieler und die Bühne

Um circadiane Oszillationen von Neurospora und anderen Organismen zu verstehen, müssen zunächst die Spieler des Spiels charakterisiert werden. Wenn eine rhythmische Variable gefunden wurde, muss entschieden werden, ob sie ein Zeiger der Uhr oder ein Teil des Uhrwerks ist. Gehört sie zu den Zustandsvariablen oder nur zu den Parametern, die den Oszillator charakterisieren? Wenn es sich um einen Bestandteil des Uhrwerks handelt, müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

• Behandlungen oder Mutationen, die Phase oder Periode des circadianen Rhythmus

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>Heterokaryons werden hergestellt, indem man Mycelien zweier verschiedener Genotypen so miteinander verschmilzt, dass verschiedene Allele eines Locus in verschiedenen Kernen sind, aber das gleiche Cytoplasma haben.

beeinflussen, ändern auch die Eigenschaften der zur Diskussion stehenden Komponente.

- Störungen der Komponente (chemische, Mutationen) verändern Phase oder Periode aller beobachteten Rhythmen.
- Sowohl Zunahme als auch Abnahme der Komponente beeinflusst die beobachteten Rhythmen, und zwar gegenläufig.
- In einem Modell, das die bekannten Eigenschaften des Oszillators simuliert, muss die Komponente als Zustandsvariable oder als Parameter erscheinen.

Im folgenden werden einige der wesentlichen Komponenten des circadianen Uhrwerks vorgestellt. Es gibt sicherlich noch mehr.

**FRQ:** Das Produkt FRQ der *frq*-mRNA des *frq*-Gens ist eins der Hauptspieler im circadianen Spiel von *Neurospora crassa*. Das *frq* Gen wurde kloniert (durch Chromosomen walk) und sequenziert (siehe Abbildung 16.13 und Aronson et al. (1992), Aronson et al. (1994b)). Es ist eine 7.7 kb DNA mit zwei Transkripten (4 und 4.5kb). Die Struktur ist in Abbildung 16.13 gezeigt. Wird eins der beiden Transkripte deletiert, fällt die Funktion aus.

Die Mutation  $frq^3$  betrifft Aminosäure 364 (mit einer Periodenlänge von 24 Stunden statt 21.5 beim Wildtyp bei 25<sup>0</sup>C). Die Mutation  $frq^7$  und  $frq^8$  betrifft Aminosäure 459 (mit einer Periodenlänge von 29 Stunden). Die Mutation  $frq^3$  betrifft Aminosäure 364 (mit einer Periodenlänge von 16.5 Stunden). Die Mutation  $frq^1$  betrifft Aminosäure 482,  $frq^9$  ist eine nonsense Mutation.  $frq^2 frq^4 frq^6$  betreffen Aminosäure 895 (mit einer Periodenlänge von 19 Stunden).

Alle frq-Mutationen sind Punktmutationen im ORF. Sie wurden mit Ausnahme von frq9 mit

Nitrosoguaninmutagenese gewonnen. Die Null-Mutante frq9 (vorzeitiges Ende bei 674), erhielt man durch UV-Mutagenese mit einer Deletion eines Basenpaares, wodurch der Leserahmen verschoben ist. frq10 ist mit gentechnischen Methoden hergestellt worden (ohne frq Locus). Sowohl bei frq 9 als auch bei frq10 variiert die Periodenlänge bei unterschiedlichen Temperaturen stark. Die Temperaturkompensation des Rhythmus ist aufgehoben. Es handelt sich um Missense- oder Nonsense-Mutationen im frq-ORF. Regulations-Region, Promotor-Region und kleines Transkript sind nicht betroffen. Bei frq2 ist ein Alanin in ein Threonin mutiert, bei frq 7 ein Glycin in Asparaginsäure. Alle Mutanten mit längerer Periode sind im nicht-konservierten Bereich mutiert, alle Mutanten mit kürzerer Periode (frq 1, 2, 4, 6) im konservierten Bereich.

Vergleicht man die Sequenzen mit anderen Neurospora-Arten, sind sie hoch homolog. Das frq-Homolog entfernter verwandter Arten (Sordaria fimicula) macht die frq-Null-Mutante von Neurospora crassa wieder rhythmisch, obwohl Sordaria keine Konidien bildet. frq ist also kein Gen, welches nur bei der asexuellen Entwicklung beteiligt ist. Vielmehr ist es ein Kontrollgen, das für die Funktion der circadianen Uhr wichtig ist. FRQ ist bei Neurospora für die Periodenlänge verantwortlich und für die Temperaturkompensation der Uhr. Diese Uhr steuert verschiedene Stoffwechselwege (Merrow et al. (1999), Aronson et al. (1994b)).

WC-1, WC-2 und WCC: Zwei weitere Spieler sind wichtig, White Color WC-1 und WC-2. Sie werden durch die wc-1 und wc-2 Gene exprimiert. Beide wurden kloniert. wc-Mutanten haben eine niedrige frq-Expression im Dunkeln und zeigen keinen circadianen Rhythmus. Auch Temperatur kann bei diesen Mutanten keinen Rhythmus induzieren. Das zeigt. dass WC-1 und WC-2 Komponenten der Uhr sind oder eng mit Faktoren der Uhr verbunden sind. Es handelt sich um Transkriptionsfaktoren mit DNA Bindungsstellen, trans-



Abbildung 16.13: Lage und Struktur des frq-Gens von Neurospora crassa. Das frq-Gen liegt auf dem rechten Arm des Chromosoms VII zwischen oli und for. Eine physikalische Karte (darunter) ergänzt diese genetische Karte und zeigt die Lage des frq Gens etwa 50 kb von oli entfernt. Die Position wurde durch Inserte von Phagen ( $\lambda$ ) und Cosmiden (cos) bestimmt. Ein 7.7 kb DNA Fragment mit dem frq Gen in der Mitte ist gezeigt. Der frq Locus besteht unter anderem aus einem offenen Leserahmen ORF, das für ein 4.5 kb großes Transkript kodiert (oberer Pfeil nach rechts). Möglicherweise gibt es noch ein überlappendes seltenes Transkript (Pfeil nach links), das vielleicht vom gegenstrang kodiert wird. Außerdem scheint noch ein weiteres kleines kodierendes Transkript vorhanden zu sein (zweiter Pfeil nach rechts). Das große Transkript kodiert für ein Protein (ganz unten) mit 989 Aminosäuren. es enthält einen basischen Teil (blau), TG/SG repeats (violett), eine Kernlokalisations-Sequenz (rot), eine Helix-turn-Helix Domäne (grün), konservierte saure Domänen (gelb) mit hohem Seringehalt, und weitere saure Gebiete (gelb). Nach Aronson et al. (1992)(Lage von frq) und Bell-Pedersen (2000)(frq-Locus und FRQ-Protein). E277/frq-gen aktivierenden Domänen und 'PAS' Domänen für Protein-Protein Interaktionen. PAS Domänen werden bei vielen regulatorischen Proteinen gefunden, die bei der Signalübertragung und Wahrnehmung verschiedener Reize (Licht, chemische Verbindungen, Sauerstoff) eine Rolle spielen. Im vorliegenden Fall erkennt die PAS Domäne Bindungsstellen Licht regulierter Promotoren und dient vielleicht dazu, zwischen Rezeptoren und Signal-Transduktions-Komponenten zu interagieren. PAS Domänen finden sich auch in Phytochromen und in anderen Uhr-Proteinen (zum Beispiel im PER von Drosophila). Das könnte darauf hinweisen dass Uhr-Proteine sich aus Proteinen entwickelten, die auf Licht reagieren (Crosthwaite et al. (1997)). Außerdem gibt es eine Sequenz-Homologie zwischen WC und PER, die sich offenbar auch auf die circadiane Uhr der Maus erstreckt (Antoch et al. (1997), King et al. (1997)).

WC-1 und WC-2 dimerisieren miteinander und bilden dabei den White Color Komplex WCC. Die PAS Domäne wird zur Dimerisierung benutzt. WCC bindet an zwei Stellen an den Promoter des frq Gens. Dadurch wird die Expression des frq Gens aktiviert. Die primären Transkripte werden in einer komplexen Art gespliced, was größere Wirkungen auf das produzierte Proteine hat. WCC überträgt Licht Signale auf Licht-empfindliche und Uhr-kontrollierte Gene (Pfeile auf frq, wc-1 und ccg in Abbildung 16.15). WC-2 ist ein häufiges, konstitutives Kernprotein, welches als Gerüst dient, um FRQ und WC-1 (die außer Phase sind) miteinander interagieren zu lassen (Denault et al. (2001)).

**VVD:** Kürzlich wurde ein weiterer Spieler im circadianen System von *Neurospora* gefunden. Das vivid Gen (vvd) transkribiert VVD, ein neu entdecktes Mitglied der PAS Proteine. Es wurde geklont und charakterisiert (Heintzen et al. (2000)). Licht induziert es rasch, aber es wird unabhängig davon von der circadianen Uhr kontrolliert. Es ist ein kleines Protein mit einer PAS Domäne. Es beeinflusst Eingang *und* Ausgang der Uhr, ohne Teil des Uhr-Mechanismus zu sein (vvd Null-Mutanten sind noch rhythmisch).

**Andere Spieler:** Andere Spieler müssen am circadianen System von *Neurospora* beteiligt sein, da *frq*-Null Mutanten noch rhythmisch sind (allerdings nicht circadian). Diese Spieler sind bisher nicht bekannt (siehe Unterabschnitt 16.8.2).

#### 16.8.2 Das Spiel

Das Produkt FRQ des *frq*-Gens ist eine essentielle Komponente (eine Zustandvariable) des circadianen Oszillators von *Neurospora*. Die mRNA und Protein-Produktion des *frq*-Gens sind Teile des Rückkopplung-Systems, aus dem die circadiane Uhr besteht. Die Produkte des *frq*-Locus regulieren sich selbst (Aronson et al. (1992), Aronson et al. (1994b)). Das scheint bei circadianen Oszillatoren allgemein der Fall zu sein. Das zugrunde liegende Prinzip wurde durch Ruoff et al. (1999) mit einem molekularen Rückkopplungs-Oszillator von Goodwin (Goodwin (1965), Abbildung 16.14) simuliert.

Vor allem durch molekularbiologische Daten der Gruppe von Dunlap wurde ein spezifischeres Modell für die circadiane Uhr von *Neurospora* entwickelt, welches in Abbildung 16.15 gezeigt ist. Danach ist das Produkt FRQ des frq Gens eine essentielle Komponente des circadianen Oszillators. Die mRNA und das FRQ Protein des frq gens sind Teile des Rückkopplungssystems, in dem FRQ seine eigene Expression über den *white color* Komplex WCC regelt (Lee et al. (2000)). FRQ würde demnach eine Zustandsvariable im circadianen System sein



Abbildung 16.14: Molekularer Rückkopplungs-Oszillator nach Goodwin. Das Uhr-Protein Y hemmt seine eigene Transkription aus der UhrmRNA (X) über den Transkriptionsfaktor Z. Die Produktionsrate der Zwischenprodukte Y und Z sind lineare Funktionen der Konzentrationen von X beziehungsweise Y. Die X Produktion verläuft ohne Hemmung mit konstanter Geschwindigkeit. Sie wird jedoch durch Z auf Grund des Hemm-Faktors  $f_i$  gehemmt. Jedes Zwischenprodukt I (X, Y oder Z) wird in folgender Weise  $\rightarrow k_s \rightarrow I \rightarrow k_d \rightarrow I$  (S) produziert und abgebaut, wobei k<sub>s</sub> die Syntheserate-Konstante  $(k_1, k_2, k_3)$  und  $k_d$  die Abbaurate-Konstante  $(k_4, k_5, k_6)$  ist. I in (S) schwankt zwischen hohen und niedrigen Werten je nachdem, ob die Synthese- Reaktionen ablaufen oder, auf Grund der Hemmung durch Z, nicht ablaufen. Die Reaktionskette (S) besagt, dass die Relaxationszeit (Zeitskala der Annäherung an das Gleichgewicht in I) nur von k<sub>d</sub> abhängt, und dass die Periodenlänge der Oszillation nur durch  $k_d$  bestimmt wird.

Reaktion R1: Bildung von X, R2: Synthese von Y, R3: Produktion von Z, R4 bis R6 (rote Pfeile): Abbaureaktionen. Hemmfaktor  $f_i = 1/1 + z^9$ . Nach Ruoff et al. (1999), auf Goodwin (1965) und Murray (1993) basierend. 272B/Goodwin (Aronson et al. (1994b)). Dass die Proteinsynthese für die Übertragung des Blaulicht-Signals auf die circadiane Uhr wichtig ist, war bereits seit einiger Zeit bekannt, da Proteinsynthese-Hemmer mit der Phasenverschiebung durch Lichtpulse interagieren und als Puls gegeben den Rhythmus je nach Zeitpunkt der Zugabe phasenverschieben. FRQ wird mit der Zeit immer stärker phosphoryliert, vor allem durch eine Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphokinase. Seine Konzentration sinkt mit der Phosphorylierung ab (Yang et al. (2001)).

Das *frq*-Gen wird in zwei Formen abgelesen, als sFRQ und als lFRQ, Sie sollen für die **Temperaturkompensation** zuständig sein (siehe Abbildung 16.16 und 16.17). Durch Phosphorylierung werde die beiden FRQ-Formen abgebaut.

Licht beeinflusst das circadiane System, indem es die frq Exprimierung über den WCC Komplex aktiviert. Der Komplex wird durch Dimerisierung des WC-1 und WC-2 Proteins gebildet (Einzelheiten auf Seite 395). Abbildung 16.15 illustriert den Weg, auf dem Licht das Uhrwerk beeinflusst, und Abbildung 16.18 zeigt Einzelheiten des Lichteffektes auf den WCC Komplex und seine Änderungen.

Es wurde vorgeschlagen (Loros (1995)), dass Licht die circadiane Uhr beeinflusst, indem es die negative RÜCKKOPPLUNG des FRQ auf seine eigene Synthese ausschaltet: Die Repression durch FRQ wird aufgehoben (oder: trotz Gegenwart von FRQ findet Induktion statt). Dieser Effekt des Lichtes kann aufgehoben werden, wenn die Proteinsynthese oder mRNA Produktion gehemmt werden. Licht erhöht die frq-RNA-Menge um das 4 bis 25fache (Crosthwaite et al. (1995)). Bereits zwei Minuten nach dem Lichtpuls steigt die frq-Transkription und erreicht ihren höchsten wert 15 Minuten später. Danach nimmt es ab. Der Übergang in Dunkelheit verringert die Menge an frq Transkript durch Abbau. Zusätzli-



Abbildung 16.15: Modell des Rückkopplungs-Oszillators von *Neurospora crassa.* mRNA und FRQ Protein Produktion des *frq*-Gens sind Teile des Rückkopplungs- Systems im circadianen Uhrwerk. FRQ spielt mehrere Rollen. Es reguliert die *frq*-mRNA über trans-wirkende Faktoren circadian regulierter Elemente (CCRE's) und bewirkt auf diese Weise eine spezifische Transkription zu bestimmten Tageszeiten. Es aktiviert weiterhin direkt oder indirekt Gene, die auf diese Weise durch die circadiane Uhr kontrolliert und deshalb 'clock controlled genes' (ccg's) genannt werden.



Abbildung 16.16: Temperaturwirkungen auf den frq Oszillator von Neurospora: Das frq-Gen wird in zwei Formen abgelesen, nämlich als sFRQ (hellgrün) und als lFRQ (dunkelgrün), die für die Temperaturkompensation verantwortlich sein sollen (siehe auch Abbildung 16.17). Durch Phosphorylierung werden die beiden FRQ-Formen abgebaut. Nach Dunlap et al. (1998). E276Dq2/neuro-modell



😑 🛛 60s ribosomal subunit

🥤 80s ribosome engaged in protein synthesis 👌

Abbildung 16.17: Die frq-Gene von Neurospora werden vom Initiierungs-Codon AUG#1 oder AUG#2 aus abgelesen. Es entsteht ein kürzeres Protein sFRQ oder ein längeres Protein lFRQ. Wie viel von jedem gemacht wird, wie also das Verhältnis der beiden Formen zueinander ist, hängt von der Temperatur ab. Auf diese Weise soll die Temperaturkompensation des circadianen Oszillators von Neurospora entstehen. Durch Phosphorylierung werden die beiden FRQ-Formen abgebaut. Nach A38 (n.d.). E276A/neuro-frqs Abbildung 16.18: Wirkung des Licht auf den molekularen Rückkopplungs-Oszillator von Neurospora. Das Uhr-Protein FRQ (rechts) hemmt seine eigene Transkription durch die frq-mRNA (oben rechts) über einen Transkriptionsfaktor (unten). Im Licht wird die frq-Transkription auf folgende Weise erhöht: Licht wird über einen Flavin-Rezeptor aufgenommen und interagiert (rote Pfeile vom Flavin- Rezeptor) mit der frq Gen Expression. Der WCC Komplex (WC-1, lila und WC-2, braun) spielen hier eine entscheidende Rolle. WC-1 wird konstitutiv im Dunkeln exprimiert (unten). Mit Licht bildet es mit WC-2 den WCC Komplex. Dieses neu synthetisierte WCC (zweites von unten) wird sowohl im Licht als auch im Dunkeln inaktiviert. Eine äußerst wenig phosphorylierte Form des WCC (drittes von unten) tritt im Dunkel auf und wirkt als Transkriptionsfaktor für frq (hellgelber Pfeil). Es kann durch den Transkriptionsfaktor gehemmt werden. Licht aktiviert eine Kinase, die die Phosphorylierung des WC-1 im WCC erhöht (viertes von unten). Das verstärkt die frq-Transkription (großer gelber Pfeil). Außerdem ist der Transkriptionsfaktor nicht mehr in der Lage, die Transkription zu hemmen. Hyperphosphoryliertes WC-1 wird abgebaut (oben mit linkem roten Pfeil). Neu synthetisiertes WC-1 ersetzt dieses WC-1 und das WCC wird wieder inaktiv. Nach Ruoff et al. (2001). E274B/wc-model

che Hemmung des frq-Promotors durch FRQ setzt die Uhr neu (Aronson et al. (1994b)). Aktivierung tritt auf, wenn Licht während der späten Nacht oder am frühen Morgen gegeben wird und ist der erste Uhr-spezifische Effekt des Lichtes. Wird die Synthese des FRQ blockiert, kann Licht die Uhr nicht mehr zurücksetzen (Crosthwaite et al. (1995)). Dieses Modell-Konzept erklärt die Wirkung einzelner Lichtpulse auf den Rhythmus der Konidienbildung im Dauerdunkel, das Verhalten unter Licht-Dunkel-Wechsels und unter Skelett- Photoperioden. Es erklärt auch, wie ein Lichtsignal den Rhythmus verfrüht oder verzögert je nach der Phase, zu der es gegeben wurde (Abbildung 16.15).

Die phasenverschiebende Wirkung des Lichtpulses läuft nach diesem Modell folgendermaßen ab: Licht wird vom Photorezeptor aufgenommen und induziert sehr rasch die Expression von frq, wenn es während der späten Nacht oder am frühen Morgen gegeben wurde (die circadiane Aktivierung würde einige Stunden dauern). Die Menge an frq mRNA und FRQ steigt früher als ohne Lichtpuls und verfrüht den Rhythmus. Licht am späten Tag und frühen Abend erhöht die Expression der frq- und FRQ-Synthese unmittelbar. Das verzögert den FRQ-Abbau und der Rhythmus wird verzögert. Es gibt eine enge Korrelation zwischen der Dosis-Respons der frq mRNA und der Phasenverschiebung als Reaktion auf die Lichtmenge. Wird die Synthese von FRQ blockiert, kann Licht die Uhr nicht mehr verstellen (Crosthwaite et al. (1995)).

WCC überträgt Lichtsignale auch auf Lichtempfindliche und Uhr-kontrollierte Gene (Pfeile auf frq, wc-1 und ccgs in Abbildung 16.16, Arpaia et al. (1993)) unabhängig vom Effekt auf die Uhr. Es gibt weitere Gene, die sowohl durch die Uhr als auch direkt durch Licht kontrolliert werden.

Schließlich ist vivid Gen (vvd) am Spiel betei-

ligt. Es beeinflusst Eingänge und Ausgänge der Uhr. Es wird durch Licht induziert, aber unabhängig davon durch die circadiane Uhr kontrolliert, ohne ein Teil des Uhr-Mechanismus zu sein (siehe Abbildung 16.19).





Abbildung 16.19: Das vivid Gen vvd wird durch Licht induziert, dass es über einen Photorezeptor PR via Transkriptionsfaktor WCC (besteht aus WC-1, violett, und WC-2, braun, oben) empfängt. Es koppelt entweder über den Eingangsweg des Lichtes zurück auf den Transkriptionsfaktor WCC des frq gens (unten) (unteres ?) oder zum Lichtsignal-Transduktionsweg des Photorezeptors zum Transkriptionsfaktor WCC des frq Gens (oberes ?), aber nicht (no) zum Photorezeptor (punktierter Weg). Das vivid Gen wird also durch Licht induziert, aber unabhängig davon durch die circadiane Uhr kontrolliert, ohne ein Teil des Uhr-Mechanismus zu sein. Nach von Linden (n.d.) . E274E/vivid-gene

#### Temperatur

Wie Lichtpulse sind auch Temperaturpulse in der Lage, den circadianen Rhythmus von *Neurospora* zu verschieben (Francis and Sargent (1979), Liu et al. (1998), Gooch et al. (1994)). Innerhalb bestimmter Grenzen wird die Periodenlänge nur geringfügig von der Umgebungstemperatur beeinflusst. Sowohl Temperaturpuls-Wirkungen als auch Temperaturkompensation der Uhr müssen durch ein vernünftiges molekular-biologisches Modell erklärt werden können.

Temperatureffekte werden bei Neurospora durch post-transkriptionale Kontrolle erzeugt (Liu et al. (1998)). Während der Translation werden zwei verschiedene FRQ Formen von zwei Initiations-Codons gemacht, nämlich sFRQ und lFRQ. Jede dieser Formen könnte zu einer Oszillation bei bestimmten Temperaturen führen, aber für einen robusten Rhythmus sind beide nötig (Liu et al. (1997)). Nicht nur die Menge des FRQ hängt von der Temperatur ab. Die Temperatur bestimmt auch das Verhältnis von sFRQ zu lFRQ, indem es verschiedene Initiations-Codons bei unterschiedlichen Temperaturen bevorzugt. Wird eine der Initiations-Codons deletiert, ist der Temperaturbereich geringer, der die Rhythmik erlaubt. Dieser Adaptationsmechanismus vergrößert also den physiologischen Temperaturbereich für die Funktion der Uhr (Garceau et al. (1997)).

Das Einstellen des Rhythmus durch eine Temperaturstufe reflektiert ebenfalls posttranskriptionale Regulationen. Obwohl die Oszillationen bei verschiedenen äußeren Temperaturen gleich sind, unterscheiden sich die mittleren Niveaus, um die die FRQ-Werte schwanken. Bei einer höheren Temperatur ist das Niveau höher (in Abbildung 16.20 illustriert).

Eine Temperaturstufe nach oben oder unten entspricht verschiedenen Phasen der Uhr, obwohl die Komponenten nicht synthetisiert oder abgebaut werden. Nach der Stufe werden die relativen Mengen von *frq* mRNA und FRQ entsprechend der neuen Temperatur empfunden, und die Rückkopplungsschleife reagiert rasch und proportional dazu in seiner Dynamik. Wenn es nicht genug FRQ nach der Temperaturstufe gibt, um WCC abzuschalten, wird mehr gemacht. Auf diese Weise verstellt die Temperatur anders als ein Lichtpuls den Rhythmus unmittelbar und aus der Rückkopplungsschleife heraus. Auch kleine Temperaturänderungen können die Phase stärker als Lichtpulse beeinflussen.

Temperaturkompensation soll das Ergebnis der Expression unterschiedlicher Mengen der beiden verschiedenen Arten von FRQ bei höherer und niedrigerer Umgebungs-Temperatur sein (Liu et al. (1997)). Bei höherer Temperatur wird mehr sFRQ gemacht, bei niedrigerer Temperatur mehr IFRQ. Somit hängt das Verhältnis der beiden FRQ's zueinander von der Temperatur ab. Auf diese Weise soll die Temperaturkompensation der circadianen Oszillationen von *Neurospora* zustande kommen (Abbildung 16.15).



Abbildung 16.21: Temperaturkompensation der circadianen Bildung von Konidien bei *Neurospora* durch Verwendung des Goodwin Oszillator-Modells (Abbildung 16.14) mit negativer Rückkopplung. Die Temperaturabhängigkeiten der Periodenlänge der circadianen Konidienbildung der *Neurospora* Mutante frq-7 (grün) und frq-1 (blau) werden durch das Modell recht gut vorausgesagt (Kreise sind Voraussagen, Dreiecke experimentell gefunden). Auch die Temperaturkompensation des Wildtyps wird im Modell gefunden. Nach Ruoff et al. (1997). E272A/goodwin oscillator



Abbildung 16.20: Die Uhr von *Neurospora* wird mit einer Temperaturstufe nach oben (links) auf Abend verschoben (rote Pfeile), wo das FRQ-Niveau niedrig ist (obere Kurve). Temperaturstufen nach unten (rechts) verschieben zu einer Morgenphase, wo das FRQ-Niveau hoch ist, und zwar unabhängig von der Phase des Zyklus, zu dem die Stufe erfolgt (Ursprung des roten Pfeils). Nach Dunlap (1999). d272E/ reset-neurospora

**FLO Oszillator** Die Rolle des FRQ wurde kürzlich in zweierlei Weise neu interpretiert: Eine Gruppe zieht in Zweifel, ob es wirklich ein essentieller Bestandteil des circadianen Uhrwerks ist (also ein Rädchen im Uhrwerk). Sie behauptet, dass FRQ nur an Prozessen beteiligt ist, die vor dem eigentlichen Oszillator liegen und (über Lipid-Signale?) auf den richtigen Oszillator einwirken (Roenneberg and Merrow (1998), Lakin-Thomas (2000)). Es wurde vorgeschlagen (Roenneberg and Merrow (1998)), Transkription und Feedback des Proteins auf seine eigne mRNA-Bildung aus dem eigentlichen Oszillator herauszunehmen (Abbildung 16.22).

Die andere Gruppe fügt einen weiteren Oszillator (oder vielleicht auch mehrere?) zum FRQ-Oszillator hinzu (so genannter FRQ-less Oszillator FLO). Obwohl der FRQ Oszillator für den circadianen Rhythmus benötigt wird, ist er wahrscheinlich nicht ausreichend (Iwasaki and Dunlap (2000)).

Gründe dafür, einen zusätzlichen Oszillator anzunehmen, sind frühere Berichte über die frq9 Mutante (Loros and Feldman (1986), Loros et al. (1986)). Danach zeigt diese Mutante noch einen Rhythmus, auch wenn ihm mehrere Charakteristika eines echten circadianen Rhythmus fehlen. So taucht der Rhythmus nur in einem Teil der Kulturen in den Wachstumsröhrchen auf, die Periodenlänge ist ziemlich variabel (12 bis 35 Stunden), der Rhythmus kann nicht durch Lichtzyklen synchronisiert werden, und er besitzt keine Temperatur- und Nährmedium-Kompensation. Sie erinnert uns an den eigentümlichen Rhythmus von Thalassomyxa australis (siehe Abschnitt 18.4) und stellt vielleicht einen Entwicklungsrhythmus dar.

#### 16.8.3 Ziele des Spiels

Das Spiel hat folgende Ziele:

- Eine zuverlässige Uhr: Der Mechanismus eines circadianen Oszillators, der aus miteinander verknüpften positiv und negativ wirkenden Rückkopplungsschleifen besteht, bestimmt nicht nur die Periodenlänge der circadianen Uhr, sondern verleiht ihr auch Robustheit und Zuverlässigkeit. Die Stärke der FRQ Oszillation und damit die Robustheit des Rhythmus nehmen mit der Menge an WC-1 und WC-2 zu (Yang et al. (2001)).
- Synchronisation durch Licht: Eine circadiane Uhr ist in der Lage, auch unter Dauerlicht (oder Dauerdunkel) und konstanten Temperatur-Bedingungen zu laufen und von ihr abhängige Ereignisse zu steuern. In der Natur muss sie aber auf den 24 Stunden Tag synchronisiert werden. Sonst würde sie rasch außer Takt kommen mit dem Tag-Nacht-Zyklus und könnte nicht mehr als zuverlässige Uhr dienen. Wir sahen, dass dafür Photorezeptoren und Transduktions-Wege zur Uhr vorhanden sind.

#### Synchronisation durch Temperatur:

Temperaturzyklen sind bei *Neurospora* noch stärkere Zeitgeber als Licht-Dunkel-Zyklen. Das könnte für einen Pilz wichtig sein, der oft auf Substraten wächst, die nicht dem Tageslicht ausgesetzt sind.

- **Temperaturkompensation:** Zusätzlich liefert der circadiane Uhr-Mechanismus von *Neurospora* eine Temperaturkompensation, die für eine zuverlässige Uhr wichtig ist.
- Photoperiodismus bei *Neurospora*? Es wurde kürzlich diskutiert, ob die jahresperiodische Sporenabgabe, die man oft bei Pilzen findet, auch bei *Neurospora* vorhanden ist und ob sie photoperiodisch kontrolliert wird (Roenneberg and



Abbildung 16.22: Nach Lakin-Thomas ist FRQ nicht direkt ein Bestandteil des circadianen Oszillators, sondern vielmehr ein Teil vor dem Oszillator. Licht wirkt über WC-1 und WC-2 auf FRQ (Temperatur und Signale der Entwicklung beeinflussen ebenfalls FRQ). FRQ beeinflusst den circadianen Oszillator über Lipid-Signale. Experimente mit der Mutante *cel* und *chol-1* sprechen für diese Interpretation. CEL und CHOL-1 beeinflussen die Lipid-Zusammensetzung und damit das Lipid- Signal und den Oszillator. Der circadiane Oszillator kontrolliert 'clock controlled genes' (ccg's), die Konidienbildung und andere Prozesse beeinflussen. Der circadiane Oszillator hat Ausgänge und einer von ihnen koppelt auf die Lipid-Zusammensetzung zurück. Nach Lakin-Thomas (1998). E278/Lakin-modell

Merrow (2001)).

## 16.9 Ausgänge der Uhr und Kontrolle der Zeiger

Das circadiane System von Neurospora und wahrscheinlich das anderer Organismen ist also sehr viel komplizierter als ursprünglich gedacht. Im letzten Abschnitt haben wir uns mit dem Uhrwerk beschäftigt und wie man es untersuchen kann. Da der Mechanismus bisher nicht gut bekannt ist, müssen wir die Zeiger der Uhr benutzen, um auf die Eigenschaften der Uhr zu schließen, oder Mutanten verwenden, die die Uhr beeinflussen. Die Ausgänge der Uhr und die Art, wie die beobachteten Rhythmen hervorgebracht werden, sind aber ebenfalls wichtige Teile des circadianen Systems und es lohnt sich, sie zu untersuchen. Außerdem sollte es auch helfen, den zu Grunde liegenden Mechanismus zu verstehen, wenn man die Wege der äußeren Rhythmen bis zur Uhr zurückverfolgt.

Der am besten untersuchte circadiane Rhythmus von *Neurospora* ist das Umschalten des Wachstums auf und unter der Oberfläche auf Wachstum der Hyphen in die Luft und die darauf folgende Konidienbildung. Rhythmische Konidienbildung zeigt sich nur an der Wachstumsfront des Myceliums, während es über solides Medium wächst. Dort wird entschieden, ob Lufthyphen, Konidiosporen und Carotinoide gebildet werden oder nicht.

Viele biochemische Rhythmen sind mit diesem Umschalten in der Entwicklung verbunden. Beispiele sind die Menge an Hyphen, an Lufthyphen, Hyphenverzweigungen, Bildung eines Septums, das Abgeben reifer Konidien, Teilung des Kernes, Glykolyse, Lipidstoffwechsel, der Glyoxalatzyklus, der Tricarbonsäurezyklus, die Ablagerung von Lipiden, die Bildung von Kohlenhydraten, CO<sub>2</sub> Produktion, die Aktivität einer Reihe von Enzymen. Es muss natürlich erst einmal geprüft werden, ob diese Vorgänge nur deshalb rhythmisch sind, weil sie von der Konidienbildung abhängen. Alternativ könnten diese Rhythmen auch unabhängig von ihr entstehen. Um zu zeigen, dass zum Beispiel bestimmte Enzyme unabhängig von der Konidienbildung einen circadianen Rhythmus zeigen, müssen die damit verbundenen morphologischen Änderungen unterbunden werden. Das kann erreicht werden, indem man zum Beispiel Flüssigkulturen verwendet (siehe Seite 366). Nicht nur bei Untersuchungen an Neurospora, sondern auch bei solchen an anderen Organismen wurde gefunden, dass die circadiane Uhr vor allem Enzyme an entscheidenden Punkten des Stoffwechsels kontrolliert. Das scheint ein allgemeines Prinzip circadianer Kontrolle zu sein.

Andere Ereignisse im Lebenszyklus von Neurospora stehen unter circadianer Kontrolle. Die Energieladung (siehe Seite 366) schwankt circadian (Delmer and Brody (1975), Schulz et al. (1985)), ebenfalls die Hitzeschock-Proteine (Kallies et al. (1998)), und die Abgabe von Ascosporen wird gleichfalls circadian kontrolliert (Brody, unveröffentlicht). Die Periodenlänge entspricht der der Konidienbildung.

Die Gesamtheit der mRNA und rRNA schwanken *nicht* circadian. Allerdings werden viele Gene von der Uhr kontrolliert (Loros et al. (1989)).

#### 16.9.1 Uhr-kontrollierte Gene

Gene, die auch unter konstanten Bedingungen rhythmisch mit einer Periodenlänge exprimiert werden, die dem Genotyp des Stammes entspricht, werden clock-controlled Gene ('ccgs') genannt. Geht die Funktion dieser Gene verloren, wird die Uhr nicht beeinflusst. Ihre Funktion ist auf den Ausgang der Uhr beschränkt. Sie müssen von Genen unterschieden werden, die durch die Entwicklung reguliert werden und von solchen, die auf Umweltänderungen reagieren. Uhr-kontrollierte Gene werden über Faktoren von der circadianen Uhr getrieben, die Phasen-spezifische Zeit-Informationen an ihre Ziel-Gene geben (siehe Abbildung 16.23). Einzelheiten dieser Kontrolle von rhythmischen Ereignissen sind von Loros and Dunlap (2001) besprochen worden. Inzwischen sind eine ganze Reihe von ccgs bekannt und viele werden hinzukommen, wenn differentielles Screening und Mikroarray-Analyse verwendet werden. Ihre Funktionen sind in der Regle bekannt (Tabelle 2 in Loros and Dunlap (2001)). Die ccq-2 zum Beispiel ist mit dem eas Gen identisch und kodiert für Hydrophobin. Es enthält eine 68 Basenpaar Promoter-Sequenz, die nötig und ausreichend ist für rhythmische Expression. Es gibt Proteinfaktoren, die zu bestimmten Tageszeiten spezifisch an diese Sequenz binden. Auf diese Weise können Gene an die Uhr gekoppelt werden und von ihr entkoppelt werden (Bell-Pedersen et al. (2001)).

Wie diese Zeit von der Uhr abgelesen wird, ist noch nicht richtig verstanden. Wie bereits erwähnt, sind dabei transkriptionale und translationale Schritte beteiligt. Eine wirksame Methode, das zu untersuchen, ist die subtraktive Hybridisierung von Morgen- gegen AbendmRNA mit Tages-spezifischen cDNA Bibliotheken (siehe Bell-Pederson et al. (1996) und das *Neurospora* cDNA Sequenzierungsprojekt http://www.genome.ou.edu/fungal.html).

Im nächsten Schritt würde man die Promotoren der ccgs charakterisieren. Diese clock control regulatory elements (CCRE´s) definieren Uhr-Boxen. Trans-wirkende Faktoren, die CCRE´s binden und kontrollieren, müssen isoliert werden. Folgt man dieser Kaskade rückwärts, kann man schließlich Faktoren isolieren, die mit Komponenten des Uhr-Mechanismus interagieren. Einige dieser Schritte könnten für



Abbildung 16.23: Maxima der mRNA verschiedener Uhr-kontrollierter Gene von Neurospora. Während der späten subjektiven Nacht und des frühen Morgens: ccq-1 (Identität unbekannt), al-3 Geranylgeranyl-Pyrophosphat Synthase, vvd (vivid, Lichtrepressor), bli-3 (Identität unbekannt), frq (Uhr-Komponente, transkriptionaler Co-Repressor) und ccq-4 (Identität unbekannt). Während des subjektiven Abends und der frühen Nacht: ccg-12 (oder cmt, Kupfer-Metallothionein, ccg-6 (unbekannt Identität) und ccg-9 (Trehalose-Synthase), ccg-8 (Identität unbekannt), ccg-7 (Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase), ccg-2 oder eas, Hydrophobin). Aus Tabelle 2 in Loros and Dunlap (2001). E278A/ccgs peak

die einzelnen Organismen spezifisch sein, andere sind vielleicht konservativ und bei vielen Organismen zu finden.

ccgs werden oft zusätzlich durch Licht und durch Entwicklungsschritte kontrolliert (siehe Tabelle 2 in Loros and Dunlap (2001)). Es müssen also zusätzlich zu den von der Uhr kontrollierten andere spezifische Regionen vorhanden sein, die Regulationen durch Entwicklung und durch Licht an die Genexpression geben ( zum Beispiel bei *eas*).

Ob es wirklich eine strikte Unterscheidung zwischen ccgs und Genen der Uhr gibt, ist etwas fraglich geworden. So ist die Expression des *frq* gens nicht nur unter Uhr-Kontrolle, sondern zusätzlich direkt durch Licht kontrolliert.

## Kapitel 17

# Ablagerungsrhythmen

Korallen können uns erzählen, dass vor 400 Millionen Jahren ein Jahr 400 Tage hatte; Schaben fügen täglich ihrem Hautskelett eine neue Chitinschicht zu und verstärken es damit.

Beschwerde-Kasten: Hier könnten noch Jahresringe der Bäume behandelt werden (oder Verweis auf Jahresrhythmen, dort dann ausführlicher bringen (jetzt sind Baumringe nur kurz erwähnt), Ablagerung von Stärkeschichten bei Stärkekörnchen von Pflanzen und mehr. Übersicht etwas ausführlicher.

### 17.1 Korallenuhren

Jahresrhythmen können zustande kommen, indem die Entwicklung von Organismen durch 'proximate' Faktoren direkt kontrolliert oder unterbrochen wird. Ein Beispiel dafür hatten wir bereits im Kapitel 'Jahresrhythmen von Pflanzen´ kennen gelernt.

Die Ablagerung von Calcium-Karbonat bei Korallen ist ein weiteres Beispiel. Korallen sind in den warmen Meeren weit verbreitet. Sie gehören zum Stamm der *Cnidaria* (Nesseltiere) und zur Klasse der *Anthozoa*. Hartkorallen sondern einen Hartskelett-Fuß ab. Er besteht aus Banden aus CaCO<sub>3</sub>. Jeden Tag wird



Abbildung 17.1: Koralle mit Hartskelett-Fuß. Er besteht aus tagesperiodisch abgelagertem CaCO<sub>3</sub>. Die Oberfläche dieses Fußes heißt 'Epithek'. Auf dem Fuß sitzt die Koralle mit Tentakeln, einem Schlund und einer Verdauungshöhle mit Septen. Nach Runcorn (1966). E279/koralle

eine neue gebildet. Die Oberfläche dieses Fußes heißt 'Epithek' und lässt die Banden erkennen (Abbildung 17.1). Jede Nacht wird eine neue Schicht abgelagert. Es sind 20 bis 30 Schichten pro Millimeter, und man kann sie mit einem Mikrodensitometer messen. Auch die Gezeiten modulieren die Ablagerungsschichten. Außerdem kann man jährliche Veränderungen erkennen. Sie werden durch die unterschiedlichen Meerwasser-Temperaturen im Sommer und Winter verursacht. Wenn man die täglichen Ablagerungsschichten innerhalb eines Jahres bestimmt, kommt man bei rezenten Korallen auf 365; sie spiegeln also die Zahl der Tage pro Jahr wieder.

Auch fossile Korallen zeigen diese Schichten (Abbildung 17.3). Wird die Zahl der Tagesschichten pro Jahr an geeigneten fossilen Korallen bestimmt, macht man eine erstaunliche Entdeckung: Korallen, die vor 400 Millionen Jahren im Devon lebten, haben 400 Schichten pro Jahr. Demnach hatte das damalige Jahr 400 statt 365 Tage (Pannella et al. (1968)). Es ist tatsächlich bekannt, dass sich der Mond wegen der Gezeitenreibung immer mehr von der Erde entfernt. Wenn eine Schlittschuhläuferin eine Pirouette dreht, kann sie ihre Umdrehung verlangsamen, wenn sie die Arme ausstreckt. So ist es auch mit dem Erde-Mond-System: Wenn der Mond sich von der Erde entfernt, wird die Umdrehung der Erde verlangsamt. Berechnungen und Hochrechnungen aus Beobachtungen zeigen, dass ein Tag in 10 000 Jahren um 2 Sekunden länger wird. Vor 400 Millionen Jahren hatte also ein Tag nur 22 Stunden. Da sich aber der Umlauf der Erde um die Sonne nicht geändert hat, bestand das Erdjahr damals aus 400 Tagen. So findet man tatsächlich bei fossilen Korallen am Epithek mehr Schichten pro Jahr als bei rezenten<sup>1</sup>.

Auch Gezeitenrhythmen und Monatsrhythmen lassen sich an Fossilien erkennen. Vergleicht man diese 'Abdrücke' fossiler Korallen mit den physiologischen Vorgängen rezenter Organismen, die zu den zeitlichen Strukturen der Schichtenbildung führen, findet man bei Korallen aus dem mittleren Devon 13 Monatsbanden pro Jahr statt 12 bei rezenten Korallen. Ein Monat ist also heute länger als vor 400 Millionen Jahren.

Solche Geochronometer wurden bereits von Whitfield (1898) beschrieben und intensiv von Wells (1963) untersucht. Es gibt einen interessanten Artikel (Runcorn (1966)) und ein Buch (Rosenberg and Runcorn (1975)) über dieses Thema. Muscheln, Cephalopoden und Stromatolithen (Algen, *Conophyton*) zeigen ebenfalls solche Ablagerungen. Kürzlich wurden jahresperiodische Ablagerungen auch in Knochen fossiler Dinosaurier gefunden (jährliche: Curry (1998), tägliche: Ricqles (n.d.)), die vor etwa 150 Millionen Jahren lebten.

## 17.2 Rhythmische Kutikula-Ablagerungen

Unmittelbar nach der Häutung eines Insekts ist die Kutikula noch farblos, weich und dünn. Nachdem sie sich auf die endgültige Größe ausgedehnt hat, färbt sie sich aus und härtet innerhalb weniger Stunden. Sie kann sich aber noch viele Tage lang verdicken. Die epidermalen Zellen der Endokutikula sekretieren die Kutikula oft nicht gleichmäßig über den Tag verteilt ab, sondern tagesrhythmisch. Nachts wird Chitin in speziell organisierten Lamellen als Kristallite abgelagert. Am Tage wird zwar Chitin in gleicher Menge sekretiert, aber nicht in Lamellen. So entstehen pro Tag zwei Schichten, die

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Die lunare Gezeitenreibung verlangsamt die Erdumdrehung um 18.1 Sekunde pro eine Millionen Jahre, die tidale Sonnen-Erde-Interaktion um 5 Sekunden. Das

sind also 23 Sekunden pro eine Millionen Jahre Johnson and et al (1975)


Tertiär Kreide Jura Trias Perm Karbon Dev. Sil.Orthov. Camb. Präcambr. *korallenuhr* | *D281Z* | *19.4.2002* 

Abbildung 17.2: Zahl der in einem Jahr abgelegten tagesperiodischen  $CaCO_3$ -Schichten (linke y-Achse) im Fuß (Epithek) von fossilen Korallen aus unterschiedlichen Perioden der Erdgeschichte (x-Achse: Alter der Erde. Darunter Bezeichnung des Erdalters). Die rechte y-Achse gibt die Länge des Tages an, die in den jeweiligen Erdzeiten herrschte. Nach Rosenberg and Runcorn (1975). E281/tageprojahr-erdgeschichte

unter dem Polarisationsmikroskop unterschiedlich aussehen: eine doppelbrechende (lamellierte) und eine dunkle (nicht-lamellierte) Wachstumsschicht (Abbildung 17.4, Neville (1975)). Hält man Wanderheuschrecken im Dauerdunkel, wird die Kutikula über 2 Wochen rhythmisch abgelagert. Der  $Q_{10}$  beträgt 1.04 (Temperaturen von 22 bis 30° C) und die Periode ist 23 Stunden lang. In Dauerlicht von 100 Lux dämpft der Rhythmus in einem Tag aus. Die Chitin-Lamellogenese ist dann von der Uhr entkoppelt. Die Synchronisation geht nicht über normale Photorezeptoren und das neuroendokrine System: Ein verdunkeltes Bein lagert nämlich im Dauerlicht weiterhin endogen rhythmisch Chitin ab. Die Epidermiszellen sind direkt auf Licht empfindlich. Die Schwelle der Empfindlichkeit liegt zwischen 1 und 10 Lux, die maximal wirkenden Wellenlängen sind 435-520 nm. Ein Rhythmus der Chitinablagerung wurde im Dauerdunkel bei 13<sup>0</sup>C auch bei der Höhlen-Laubheuschrecke *Dolichopoda hinderi* gefunden (Neville (1965)). Bei höherer Temperatur waren die Schichten dicker, aber die Enddicke gleich. Bei höherer Temperatur gab es also weniger Schichten. Ein weiteres Beispiel ist die Neuseeland-Weta *Hemideina thoracica* (Orthoptera: Stenopelmatidae). Die Schichtenbildung wird von einem Oszillator gesteuert, der nicht identisch ist mit dem, von dem die lokomotorische Aktivität kontrolliert wird (Waddel et al. (1990)).

Tägliche Wachstumsschichten wurden auch an den inneren Anheftungsstellen der Muskeln ('Apodeme') von Fliegen und Mücken gefunden. Sie können dazu benutzt werden, das Alter von *Drosophila* Fliegen zu bestimmen, die im Freien gefangen wurden (Johnston and Ellison (1982)).



Abbildung 17.3: Jahres- (links) und tagesperiodische (rechts) Schichtenbildung im Fuß (Epithek) einer fossilen Koralle. Nach Runcorn (1966). 281A/korallenuhr



Abbildung 17.4: Tagesrhythmische Sekretion epidermaler Zellen der Endokutikula von Küchenschaben (*Leucophaea maderae*). Nachts wird Chitin in anders organisierten Lamellen abgelagert als am Tage. Es entstehen pro Tag zwei Schichten, die unter dem Polarisationsmikroskop unterschiedlich aussehen: eine doppelbrechende (lamellierte) und eine dunkle (nichtlamellierte) Wachstumsschicht. Nach Wiedenmann (1978). 282/schaben-lamellen

## Kapitel 18

# Bedeutung, Evolution und selektive Vorteile circadianer Rhythmen

Dieses Kapitel besteht vor allem aus Spekulationen. Obwohl Rhythmen weit verbreitet sind und eine Eigenschaft komplizierter Systeme sind, wurde ihr selektiver Vorteil erst in wenigen Fällen nachgewiesen. Die rhythmischen Änderungen in der Gestalt von Thalassomyxa australis können als Beispiel für einen altertümlichen Uhr-Typ ohne Temperaturkompensation und mit ungewöhnlichem Synchronisations-Verhalten dienen. Die Mechanismen, die circadianen Rhythmen zu Grunde liegen, scheinen Rückkopplungen von Genprodukten auf ihre eigene Transkription zu benutzen, aber die Zahnräder des Uhrwerks könnten sehr verschieden sein. Im augenblicklichen Zustand kann man nur spekulieren, wie circadiane Rhythmen entstanden sein könnten. So lange der Mechanismus der circadianen Uhren noch unbekannt ist, können wir die Frage nicht beantworten, ob diese Uhren sich in den verschiedenen Reichen der Organismen konvergent entwickelten.

### 18.1 Oszillationen gibt es bei allen komplizierten Systemen

Alle komplizierten dynamischen Strukturen neigen zum Schwingen. Das gilt für Maschinen, die Wirtschaft, biochemische Netzwerke, physiologische Prozesse, Ökosysteme, um nur einige zu nennen. Bei Organismen mit ihrem komplizierten Stoffwechsel, zahlreichen Regelkreisen und Rückkopplungen sind Rhythmen weit verbreitet und kommen von Prokaryonten bis zum Menschen vor.

Rhythmen sind nicht nur unvermeidbar, sondern können auch nützlich sein. Manche Ingenieure in der chemischen Industrie versuchen, Prozesskontrollen zu verbessern, indem sie rhythmisch von Durchschnittsbedingungen abweichen. Organismen benutzen diese Strategie sehr oft. So wird bei der Glykolyse-Oszillation der Hefe die gewonnene Energie erhöht (Richter and Ross (1981)). Um bei Nahrungsmangel besser zu überleben, wird von der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* cAMP Puls-förmig abgegeben statt zufallsverteilt (Nanjundiah (1987))

### 18.2 Warum circadiane Rhythmen nicht genau 24 Stunden lang sind

Warum ist die Periode circadianer Rhythmen nicht genau 24 Stunden lang, sondern in aller Regel kürzer oder länger? Es muss einen oder mehrere Vorteile geben, die während der Evolution zu diesen 'freilaufenden' Uhren geführt hat.

Ein Vorteil ist die bessere Synchronisation. Wenn die Periodenlänge der circadianen Uhr sehr eng bei 24 Stunden liegt, würde es mehrere Tage dauern, bis der Unterschied bemerkt und Gegenmaßnahmen eingeleitet werden können. Es ist also eine bessere Strategie, eine Uhr zu verwenden, deren Periode nicht genau 24 stündig ist und diese jeden Tag neu zu stellen. Damit wird die Phasenbeziehung zum Tag-Nacht-Wechsel stabiler. Eine solche Uhr, deren Periode vom 24 Stunden-Takt der Umwelt abweicht, hat einen weiteren Vorteil: Die Phasenbeziehung eines inneren Rhythmus zur Umwelt hängt von der Periodenlänge ab (Eskin (1969)). Wenn beispielsweise ein Tier früh aufwachen möchte ('early bird catches the worm'), müßte die Periode der circadianen Uhr kurz sein. Umgekehrt würde eine lange Periode dazu führen, dass das Tier spät aufwacht und sich spät zur Ruhe begibt.

### 18.3 Selektive Vorteile circadianer Rhythmen

Um circadiane Rhythmen zu erzeugen, mussten während der Evolution nur aus den schon vorhandenen Rhythmen solche ausgewählt werden, deren Periodenlänge im Bereich von 24 Stunden lagen. Circadiane Rhythmen sind unter Organismen weit verbreitet und haben einen besonderen Anpassungswert. Eine interne Uhr kann in dreifacher Weise eingesetzt werden: Sie kann dauernd nach der Zeit abgefragt werden, sie kann als Stoppuhr benutzt werden, um die Länge eines Zeitraums zu bestimmen, und sie kann als Zeitprogramm dienen, um bestimmte Aktivitäten zu bestimmten Zeiten ablaufen zu lassen.

Wir hatten dazu bereits in vorausgegangenen Abschnitten verschiedene Beispiele kennen gelernt. Ein circadianes System ermöglicht es einem Organismus, sich auf die 24-Stunden-Zeitstruktur der Umwelt vorzubereiten, die sich zum Beispiel in den regelmäßigen Änderungen im Licht-Dunkel-Wechsel und in der Temperatur des Tages zeigt. Mit einer Tagesuhr ausgestattet können Tiere den Sonnengang einkalkulieren und damit und in Verbindung mit dem Sonnenwinkel zum Nahrungsplatz oder Wohnort Sonnenkompaßorientierung durchführen (Seite 177). Photorezeptoren können ihre Lichtempfindlichkeit tagesperiodisch ändern, um sich so an die unterschiedlichen Lichtintensitäten anzupassen. Nicht miteinander verträgliche Prozesse können zeitlich voneinander getrennt werden wie zum Beispiel die Photosynthese und Stickstoff-Fixierung bei Cyanobakterien (Seite 131) oder die Phototaxis und Chemotaxis bei Chlamydomonas (Byrne and X (1992)). Circadiane Rhythmen kontrollieren somit die Vernetzungen biochemischer Vorgänge und des Energiestoffwechsels zeitlich. Enzyme können in Tag- und Nachtformen vorliegen, wie beispielsweise die Katalase bei Arabidopsis thaliana (Zhong and McClung (1996)) und die PEP-Carboxylase im CAM-Stoffwechsel, der tagesperiodisch abläuft (Seite 151). Tagesrhythmen sind die Grundlage photoperiodischer Zeitmessungen, die dafür sorgen, dass Wachstum, Entwicklung, Dormanz und andere Vorgänge in der richtigen Jahreszeit ablaufen (Abschnitt 13.1 und folgende Abschnitte).

Rhythmen können benutzt werden, um Zeiten

festzulegen, zu denen besondere Vorgänge ablaufen. Ein Beispiel ist das Schlüpfen von Drosophila pseudoobscura aus dem Puparium, wie es bereits auf Seite 307 vorgestellt wurde. Eine kompliziertere zeitliche Steuerung des Schlüpfens findet sich bei der marinen Zuckmücke Clunio marinus (siehe Seite 193). Hier wirken zwei Zeitmeßsysteme zusammen, um das Schlüpfen zur richtigen Tageszeit und zu Niedrigwasser zu ermöglichen. Das eine Systeme ist circadian, das andere vierzehntägig (Neumann (1983)). Die Befruchtung beim Palolowurm wird viel wahrscheinlicher, weil das Abschnüren der Geschlechtsprodukte nur zu einer bestimmten Tageszeit (morgens) und in einer ganz bestimmten Phasenbeziehung zum Mondzyklus (1. Tag nach dem letzten Viertel des Mondes) in zwei Monaten des Jahres (Ende Oktober, Anfang November) stattfindet (Abbildung 11.20).

In anderen Fällen ist der selektive Vorteil unbekannt oder umstritten. Blattbewegungen wurden bereits vor 2300 Jahren beschrieben und waren wahrscheinlich schon viel früher den Menschen aufgefallen. Die Blattbewegungen von *Tamarindus indica* wurden von Androsthenes 400 vor Christus auf dem Marsch Alexander des Großen nach Indien zu Papier gebracht. Biologen wie Darwin, Pfeffer, Sachs, Bünning haben versucht, den selektiven Vorteil dieser Bewegungen zu verstehen (siehe Seite 237 und folgende). Auch heute noch ist die Bedeutung umstritten; möglicherweise sind mehrere Vorteile damit verbunden (Bünning and Moser (1969), Karve et al. (1984), Enright (1982)).

Die photoperiodische Zeitmessung wird nach Bünning (1936) durch eine circadiane Uhr bewerkstelligt. Besonders bei den Landorganismen sind viele Ereignisse photoperiodisch gesteuert. Wahrscheinlich haben sich photoperiodische Mechanismen im Pflanzen- und Tierreich unabhängig voneinander entwickelt und verschiedene Prinzipien wurden benutzt (Bünning (1986)).

Wenn circadiane Rhythmen für Organismen vorteilhaft sind, sollten Störungen des circadianen Systems oder anormal Bedingungen zu Schwierigkeiten führen. Diese Hypothese wurde experimentell getestet. Fliegen wurden durch Ändern des Licht-Dunkel-Wechsels in ihrem Tagesrhythmus phasenverschoben. Die Behandlung simulierte Zeitzonen-Reisen nach Osten oder Westen. Von den Fliegen, die unter 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Bedingungen ohne Verschiebung gehalten wurden, waren 90%nach 125 Tagen gestorben. Von den phasenverschobenen waren dagegen 90% bereits nach 98 Tagen nicht mehr am Leben (Aschoff et al. (1971)). Demnach verkürzt Phasenverschiebung die Lebenserwartung dieser Fliege (Abbildung 14.15).

Verschiebungen des Licht-Dunkel-Wechsels an jedem dritten Tag verkürzte das Leben von Mäusen, Tumoren wuchsen stärker und das Immunsystem wurde unterdrückt. Wurden diese Tiere mit Melatonin behandelt, blieben die schädlichen Einflüsse aus (Li and X (1997)).

Ein ähnliches Experiment wurde von Pittendrigh and Minis (1972) an Drosophila melanogaster durchgeführt. Kontroll-Fliegen wurden in 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Zyklen gehalten, andere Gruppen erhielten kürzere (10.5 : 10.5 Stunden) oder längere (13.5 : 13.5 Stunden) Licht-Dunkel-Zyklen oder Dauerlicht. Die im 24 Stunden Tag gehaltenen Fliegen lebten signifikant länger als die in den anderen Gruppen (Abbildung 14.14).<sup>1</sup> Diese und andere Versuche an Pflanzen (Went (1959), Highkin (1954), Went (1959), Hillman (1956)) zeigen, dass es für Organismen besser ist, wenn ihre circadianen Oszillatoren mit der natürlichen 24-Stunden-Periode getrieben werden.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Die Ergebnisse konnten allerdings in einem neuen Experiment auch von den gleichen Autoren nicht reproduziert werden

An Cyanobakterien wurden Selektions-Experimente von Johnson et al. (1998a) durchgeführt. Sie benutzen Mischungen von Wildtyp und Mutanten mit geänderter Periodenlänge und hielten die Kulturen in künstlichen 22- und 30-Stunden-Tagen. Auch eine arrhythmische Mutante wurde getestet. Die Algen, deren Periodenlänge am besten mit dem angebotenen Zyklus übereinstimmt, verdrängte die Konkurrenz. Der Wildtyp verdrängte die arrhythmische Mutante (Abbildung 18.1).

Die Hypothese, dass circadiane Rhythmen für Organismen vorteilhaft sind, wurde noch in einer anderen Weise getestet. Dazu wurde mit ein spezieller Lichtpuls gegeben, während Fliegen aus ihrem Puparium schlüpfen. Dieser Lichtpuls schaltet den Schlüpfrhythmus von Drosophila pseudoobscura Fliegen nach einer Methode von Winfree (1970) aus. Es wurde erwartetet, dass die Tiere der arrhythmischen Gruppe weniger erfolgreich schlüpfen oder kürzer leben. Es gab jedoch keinen Unterschied (Mack and Engelmann (1978)). Daraus kann man aber nicht schließen, dass Tiere ohne eine intakte circadiane Uhr genauso erfolgreich sind wie die Kontrollen. Es zeigte sich nämlich, dass das Schlüpfen von einer anderen Uhr circadian kontrolliert wird als die lokomotorische Aktivität. Die Behandlung hatte die Schlüpfuhr gestoppt, aber nicht die Uhr, die das Laufen der Tiere circadian steuert.

Deshalb wurde ein anderes Experiment mit der Hausfliege *Musca domestica* durchgeführt (Abschnitt 14.16). Die Lebensdauer wurde bestimmt. Hält man die Tiere im Dauerlicht von 0.01 Lux, zeigen anfangs die meisten Tiere einen circadianen Rhythmus der lokomotorischen Aktivität. Aber mit der Zeit geht dieser Rhythmus verloren, die Tiere werden arrhythmisch. Nach 75 bis 85 Tagen sind die meisten Tiere gestorben. Von den überlebenden sind jedoch noch 50% rhythmisch, viel



Abbildung 18.1: Selektions-Experimente von Johnson et al. (1998b). Oben: Mischungen von Wildtyp (Freilaufperiode 24 Stunden) und Perioden-Mutante P28 (Freilauf-Periode 30 Stunden) im 22- (11:11 Stunden LD) und 30-Stunden-Tagen (15:15 Stunden LD) gehalten. Nach 27 Tagen war im 22-Stunden-Tag der Wildtyp zahlreicher als die Mutante. Im 30-Stunden-Tag hatte die Mutante den Wildtyp völlig verdrängt. Darunter: Mutante SP22 (Freilaufperiode 22 Stunden) hat im 22-Stunden-Tag nach 27 Tagen den Wildtyp völlig verdrängt, im 30-Stunden-Tag dagegen wurde sie vom Wildtyp verdrängt. Drittes Histogramm: P28- und SP22-Mutanten miteinander gemischt. Im 22-Stunden-Zyklus verdrängt SP22 die Mutante P28, im 30-Stunden-Tag war es umgekehrt. Unten: Die arrhythmische Mutante KaiC wird sowohl im 22-Stundenals auch im 30-Stunden-Tag vom Wildtyp verdrängt. Abszisse: Verhältnis der gemischten Stämme in Prozent. Nach Johnson et al. (1998b). D282A/cyanos-fitness

mehr als in den Tagen davor. Daraus könnte man folgern, dass *die* Tiere länger leben, deren circadianer Rhythmus unter den Schwachlicht-Bedingungen bis zum Ende intakt war (Engelmann et al. (n.d.)).

Es gibt ferner Hinweise, dass bei bestimmten endogenen Depressionen des Menschen der circadiane Rhythmus anormal ist (Halaris (1987)).

Es ist unbekannt, wie circadiane Rhythmen im Laufe der Evolution entstanden. Verschiedene Szenarien sind dabei denkbar:

- Kippert (1987) spekulierte, dass es ursprünglich nicht die Synchronisation mit der rhythmischen Struktur der Umwelt war. Vielmehr soll es nötig gewesen sein, den Stoffwechsel zwischen den endosymbiontischen Vorläufern der Organellen und den Archebakterien-artigen Vorfahren des eukaryontischen Cytoplasmas zu koordinieren. Ohne diese Koordination würden zwischen den autonomen Kompartimenten chaotische Oszillationen entstehen. Erst später kamen circadiane Rhythmen hinzu. Sie brachten einen weiteren selektiven Vorteil, indem sie den Energiestoffwechsel an den Tagesrhythmus koppelten.
- 2. Winfree (Winfree (1980), Winfree (1986)) meint, dass eine 'Warnung vor dem Morgen' (Dawn warning) zu circadianen Rhythmen geführt haben kann. Die Organismen konnten sich auf die schädlichen Wirkungen des Sonnenlichtes einstellen, bevor das Licht aktuell kam, weil die Tagesuhr dieses Ereignis im Voraus ankündigte.
- 3. Der gleiche Autor weist darauf hin, dass Rhythmen gegenüber Vorgängen im Gleichgewicht für die Zelle von Vorteil ist. Auch Chemiker verbessern Prozesskontrollen durch rhythmisches Abweichen

von Durchschnittswerten. Kompartimentierung in Raum und Zeit erlaubt, dass unverträgliche Reaktionen nebeneinander ablaufen können. Erst später haben sich dann diese Rhythmen durch Evolutionsdruck an die Rhythmen der Umwelt angepasst.

4. Ein weiterer Vorschlag von Winfree: Der Tagesrhythmus der Zellen wurde ihnen vom Licht-Dunkel-Wechsel und/oder Temperaturwechsel aufgeprägt. Erst später wurde dann von der Zelle ein Uhrmechanismus erfunden, der Änderungen antizipiert und die Übergänge glättet.

Die Hypothesen 2, 3 und 4 sind nicht auf circadiane Rhythmen der Eukaryonten beschränkt, und Winfree schlägt vor, auch bei Koloniebildenden Eubakterien (*Actinomycetes*), Streptomyceten, Tuberkulosekeimen, *Mycobacterium* und Stickstoff-fixierenden photosynthetischen Bakterien nach circadianen Rhythmen zu suchen.

### 18.4 Modellorganismus für die Evolution circadianer Rhythmen

Tagesrhythmen und circadiane Rhythmen gibt es auch bei Pilzen. Wir hatten bereits *Neurospora crassa* als Beispiel kennen gelernt (Kapitel 16). Bei Pilzen können aber auch Schwingungen beobachtet werden, die kein Korrelat in Umweltzyklen haben. Oft sind die Perioden dieser Rhythmen auch stark von der Temperatur abhängig und lassen sich nicht mit tagesperiodischen Licht-Dunkel-Wechseln synchronisieren. Selbst bei *Neurospora crassa* gibt es Mutanten, die zwar einen circadianen Rhythmus besitzen, deren Temperaturkompensation aber unvollständig ist oder fehlt (zum Beispiel bei der Mutante frq9 bei  $30^{0}$ C 22 Stunden und bei  $20^{0}$ C 93 Stunden, Loros and Feldman (1986)). In diesem Zusammenhang ist folgende Beobachtung interessant:



Abbildung 18.2: *Thalassomyxa australis* ändert seine Form rhythmisch zwischen einer aktiven Phase mit Pseudopodien (links) und Ruhephase (rechts). Nach Grell (1985). 282B/thalli

Grell (1985) entdeckte an der Westküste von Australien einen marinen Rhizopoden, den er Thalassomyxa australis nannte. Er gehört zu den Nacktamöben. Er ändert seine Form rhythmisch zwischen einer Ruhephase, in der er wie ein Hut auf dem Substrat liegt, und einer Phase, in der er mit Pseudopodien über das Substrat kriecht und dabei einzellige Meeresalgen aufnimmt und verdaut (18.2). Der Film "Der Formwechsel von Thalassomyxa australis (Promycetozoidae)" zeigt die Biologie und diesen Formwechsel (Grell (1987)). Bei einer Temperatur von 22<sup>0</sup>C beträgt die Periodenlänge 25 Stunden. Bei niedrigeren Temperaturen ist die Periode bedeutend länger. Bei 10<sup>0</sup>C zum Beispiel ist sie 90 Stunden, bei 28<sup>0</sup>C nur 18 Stunden (Silyn-Roberts et al. (1986)). Der rhythmische Formwechsel dieses Organismus ist noch nicht Temperatur-kompensiert (Abbildung 18.3). Temperaturkompensation wird aber als eine charakteristische Eigenschaft cir-



Abbildung 18.3: Formänderung von *Thalassomyxa* hängt von der Temperatur ab] Der Wechsel zwischen aktiver Phase und Ruhephase von *Thalassomyxa australis* hängt von der Temperatur des Seewassers ab. Auf der y-Achse ist die Periodenlänge, auf der x-Achse die Temperatur des Seewassers aufgetragen, in der die Amöben gehalten wurden. Nach Silyn-Roberts et al. (1986). D282C/thalli-temp



Abbildung 18.4: Rote Kreise und rote Kurven im linken Teil der Abbildung zeigen den Prozentsatz von *Thalassomyxa* Amöben in der aktiven Phase, mit Maxima als offene Dreiecke (x-Achse: Tage). Der Formwechsel von *Thalassomyxa australis* lässt sich nicht durch einen 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel synchronisieren (siehe die Lage der Maxima (Dreiecke) zu den hellen/grauen Flächen). Das wird auch im rechten Teil gezeigt, wo die Maxima jeden Tag um 5 Stunden später erscheinen. Wäre der Rhythmus synchronisiert, müssten sie genau untereinander liegen. Nach Förster and Engelmann (1988), Smietanko et al. (1988). D282D/thalli-syn

cadianer Rhythmen angesehen. Auch die Synchronisation durch einen Licht-Dunkel-Wechsel und durch einen Temperatur-Wechsel funktioniert nicht in der üblichen Art (Abbildung 18.4, Förster and Engelmann (1988), Smietanko et al. (1988)). Schütteln der Kultur (wie es im Meer durch die Gezeiten erfolgt) synchronisiert nur teilweise; dieser Zeitgeber ist also schwach (Förster and Engelmann (1988)). Kombinierte Zeitgeber (Temperaturwechsel, Licht-Dunkel-Wechsel, periodisches Schütteln als Simulation der Ebbe/Flut Bedingungen) synchronisieren (Abbildung 18.5). Es ist unbekannt, welche Zeitgeber in der Natur wirken. Möglicherweise handelt es sich also hier um einen Vorläufer circadianer Uhren, eine Art Ur-Uhr, die noch nicht alle charakteristischen Eigenschaften 'moderner' circadianer Uhren besitzt. Ob und auf welchem Wege sich diese von ultradianen Rhythmen ableiten lassen, die noch keine oder schon eine Temperaturkompensation besaßen, ist Spekulation (Silyn-Roberts and Engelmann (1986)).

## 18.5 Evolution der Temperatur-Kompensation circadianer Rhythmen

Bei typischen circadianen Rhythmen ist die Länge der Perioden fast unabhängig von der Umgebungstemperatur. Dafür ist ein Mechanismus verantwortlich, der noch nicht völlig aufgeklärt ist. Es gibt verschiedene Modelle dazu, die bereits besprochen wurden (Seite 374). Interessant sind neuere Befunde an *Neurospora crassa* (Liu et al. (1997)). Danach wird das frq-Gen je nach Temperatur in verschiedener Weise abgelesen. Bei hoher Temperatur werden mehr sFRQ-Proteine, bei niedrigerer Tempe-



Abbildung 18.5: Kombinierte Zeitgeber (Licht-Dunkel-Wechsel, Temperatur-Wechsel und Schüttelperioden im 6-Stunden-Takt, oberer Teil der Abbildung) synchronisieren den rhythmischen Formwechsel von *Thalassomyxa australis*, während weder die Kombination eines Licht-Dunkel-Zyklus und eines Temperaturzyklus (LD und T Zyklus) noch ein Licht-Dunkel-Zyklus allein (LD) den Rhythmus synchronisiert. Schütteln kombiniert mit einem Licht-Dunkel-Wechsel dagegen synchronisieren. Nach Förster and Engelmann (1988). E282E/thalli-komb

# 18.7 Evolution von Pigmentsystemen und Photorezeptoren für die Synchronisation circadianer Rhythmen

ratur mehr lFRQ-Proteine gemacht. Im Endeffekt wird bei unterschiedlichen Temperaturen die gleiche Periodenlänge des circadianen Rhythmus erreicht.

### 18.6 Organisation circadianer Rhythmen und ihre Evolution

Den circadianen Rhythmen liegen Mechanismen zugrunde, die viel komplizierter sind, als man zunächst dachte. Zwar scheint eine Rückkopplung von Genprodukten auf ihre eigene Transkription Grundlage aller bisher näher untersuchten circadianen Rhythmen zu sein (*Drosophila*, Maus, *Neurospora*, *Arabidopsis*, Cyanobakterien). Aber die dabei eingesetzten Räder des Uhrwerks können stark divergieren.

So unterscheiden sich die Proteine der Cyanobakterien, die als Teile des Uhrwerks die Transkription der kai-Gene durch Rückkopplung hemmen, von denen des Uhrwerks von Drosophila und Säugern völlig (letztere sind allerdings homolog (Ishiura et al. (1998)). Wiederum andere Proteine werden im circadianen System von Arabidopsis eingesetzt (Green (1998), Sassone-Corsi (1998)). Hinzu kommt, dass nicht nur eine circadiane Uhr die verschiedenen Vorgänge tagesperiodisch steuert. Im gleichen Organismus (Drosophila, Plautz et al. (1997)) und sogar in der gleichen Zelle (Gonyaulax, Roenneberg and Morse (1993)) scheinen vielmehr unterschiedliche circadiane Oszillatoren zu arbeiten. Und diese benutzen möglicherweise unterschiedliche Mechanismen. Die verschiedenen circadianen Oszillatoren können miteinander direkt gekoppelt sein oder über Umweltsignale in bestimmter Phasenbeziehung zueinander synchronisiert werden.

### 18.7 Evolution von Pigmentsystemen und Photorezeptoren für die Synchronisation circadianer Rhythmen

Die Zeitgeber zur Synchronisation circadianer Oszillatoren können sehr verschieden sein. Selbst bei Einzellern (*Gonyaulax*) wirken unterschiedliche Pigmentsysteme (blau und rotempfindlich) auf das circadiane System (Roenneberg and Rehman (1998)). Bei Arthropoden und niederen Vertebraten können neben den üblichen Photorezeptoren auch andere und/oder extraretinale Photorezeptoren das circadiane System beeinflussen.

Schließlich finden sich auch noch Rückkopplungen vom circadianen System auf die Rezeptoren. So kann zum Beispiel die Empfindlichkeit der Augen bei Skorpionen und Käfern mit verschiedenen Mechanismen durch das circadiane System um einige Größenordnungen verändert werden (Fleissner (1972)). Das gleiche Licht einer bestimmten Intensität wird also zu verschiedenen (subjektiven) Tages- und Nachtzeiten ganz unterschiedliche Wirkungen auf das circadiane System haben.

### 18.8 Evolution des Photoperiodismus

Wir hatten bereits Argumente und experimentelle Ergebnisse kennen gelernt, die zeigen, dass die photoperiodische Zeitmessung meistens mit einer circadianen Uhr bewerkstelligt wird (siehe Seite 281). Solche photoperiodischen Reaktionen können einen hohen Selektionswert für den Organismus darstellen. Erlauben sie ihm doch, sich in seiner Entwicklung an die günstigsten Jahreszeiten sehr präzise anzupassen. Als Schaltuhr für solche photoperiodischen Vorgänge kann die circadiane Uhr dafür sorgen, dass sich zum Beispiel ein Insekt im Langtag entwickelt und im Kurztag in Diapause übergeht.

Für Meeresorganismen sind photoperiodische Reaktionen in der Regel weniger wichtig. Hier spielen Temperaturänderungen, mit den Mondzyklen verknüpfte Änderungen im Biotop und Gezeitenkräfte eine größere Rolle. Allerdings können photoperiodische Reaktionen Jahresrhythmen von Meeresorganismen synchronisieren (Balzer and Hardeland (1991), Anderson and Keafer (1987)).

Wichtig wurden photoperiodische Reaktionen nach der Eroberung des Landes durch Pflanzen und Tiere. Besonders in den Äquatorferneren Gebieten der Erde muss die Jahreszeit präzise erfasst werden, um rechtzeitig Maßnahmen zu ergreifen, wenn die Umweltbedingungen sich verschlechtern. Photoperiodische Reaktionen sind daher bei den Organismen in den gemäßigten und höheren Breitengraden verbreitet, gut ausgebildet und unabhängig von der Umgebungstemperatur. Aber auch am Äquator gibt es Organismen, die photoperiodisch reagieren. Sie müssen ganz besonders präzise die Tageslängen messen, da sich diese im Laufe des Jahres nur geringfügig ändern. Bei manchen Reis-Varietäten können bereits Unterschiede von nur einer Minute photoperiodisch das Blühen induzieren (Kerling (1950)). Kalendervögel kommen in ihren Brutgebieten an bestimmten Tagen des Jahres an, die zum Teil nur um wenige Tage variieren (Beck (1980)).

### 18.9 Konvergente Entwicklung circadianer Rhythmen?

Bei unserem jetzigen Wissen kann man über den Verlauf der Evolution circadianer Rhythmen nur spekulieren. Solange die Mechanismen circadianer Uhren nicht bekannt sind, können wir auch nicht die Frage klären, ob sich diese Uhren konvergent in verschiedenen Organismenreichen entwickelt haben. Erste Ergebnisse liegen vor, die Licht auf die Uhrwerke werfen. Demnach wird von den bisher untersuchten Mechanismen das gleiche Prinzip verwendet: Transkriptionsprodukte hemmen ihre eigene Synthese (mRNA Bildung). Zeitverzögerungen in diesem Rückkopplungskreis sorgen für die circadianen Perioden. Aber das Räderwerk dieser Uhren scheint sich bei den verschiedenen Organismengruppen (Cyanobakterien, Arabidopsis, Tiere) zu unterscheiden (Ishiura et al. (1998), Sassone-Corsi (1998), Young and Kay (2001b)).

### 18.10 Wie, wann und warum entwickelten sich circadiane Rhythmen?

Unsere Galaxie entstand vor 12 Milliarden Jahren, die Sonne vor 5 Milliarden Jahren, die Erde vor 4.6 Milliarden Jahren.

Vor 4.0 bis 3.5 Milliarden Jahren bestand die Atmosphäre der Erde aus freiem Wasserstoff und die Temperatur betrug  $130^{0}$ C. Dann kamen Stickstoff, NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, und H<sub>2</sub>S hinzu. Vor 3.5 Milliarden Jahren stieg der CO<sub>2</sub> Gehalt an und aus einer Art 'Ursuppe' bildeten sich die ersten Organismen. Stoffwechsel und Reproduktion entwickelten sich. Aus diesen Protobioten entstanden die Eobioten, aus diesen die Prokaryonten und schließlich, vor 1.5 Milliarden Jahren, die Eukaryonten (siehe Abbildung 18.6).

Eukaryonten bildeten sich nach der Endosymbiontenhypothese durch eine Symbiose zwischen Archebakterien (*Thermoplasma*) und Prokaryonten. Letztere wurden zu Plastiden und Mitochondrien. Das war aber ein später



Abbildung 18.6: Zeitskala der Entwicklung der Erde und der Organismen von Protobioten über Eobioten zu Prokaryonten und Eukaryonten. Bildung der Erde vor etwa 4.5 Milliarden Jahren. Die ersten lebenden Zellen etwa 0.75 Milliarden Jahre nach Bildung der Erde. Erste Wasserspaltung durch Photosynthese gibt  $O_2$  ab. Nachdem  $Fe^{2+}$  in den Meeren aufgebraucht ist, beginnt rasche  $O_2$  Akkumulation. Aerobische Atmung allgemein verbreitet. Vor 1.5 Milliarden Jahren entstehen eukaryontische photosynthetische Zellen. Die ersten vielzelligen Pflanzen und Tiere vor etwa 700 Millionen Jahren. Nach Albers et al. (1994). E282F/organismen

Schritt in der Evolution der Organismen und erfolgte vor etwa 1.2 Milliarden Jahren. Prokaryonten traten vor etwa 3.5 Milliarden Jahren auf. Vor 1.8 bis 1.4 Milliarden Jahren nahm der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre durch die Photosynthese der Organismen zu. Dadurch erhielt die Erde einen Ozonschutzschild gegen ultraviolettes Licht.

Wie circadiane Rhythmen entstanden, ist nicht bekannt. Organismen besitzen viele Rückkopplungskreise in ihrem Stoffwechsel und neigen deshalb zum schwingen, wie alle komplizierten Strukturen. Wahrscheinlich waren diese rhythmischen Ereignisse anfangs noch nicht mit periodischen Anderungen in der Umwelt verbunden. Es ist bekannt, dass rhythmische Prozesse im Netzwerk biochemischer Wege und im Energiestoffwechsel effektiver sind als solche, die mit konstanter Geschwindigkeit ablaufen (Nanjundiah (1987)). Diese Kenntnis wurde inzwischen auch von der chemischen Industrie aufgegriffen: Bei bestimmten Reaktionen ändert man die Konzentration der Reaktionspartner zyklisch und erhöht damit die Ausbeute.

Sicherlich besaßen Organismen eine große Zahl von rhythmisch ablaufenden Prozessen. Wurden ihre Periodenlängen durch Zeitverzögerungen in den Bereich von 24 Stunden gebracht, konnten sie durch Zeitgeber mit dem Wechsel von Tag und Nacht synchronisiert werden. Das gab ihnen einen entscheidenden Vorteil: Sie konnten sich an den täglichen Wechsel von Licht und Temperatur schon vor Beginn des Lichtes anpassen. Der Stoffwechsel konnte beispielsweise schon auf Photosynthese umschalten, bevor die Lichtperiode begann. Ferner konnten Organismen mit einer circadianen Uhr den täglichen Lauf der Sonne einkalkulieren und sich auf diese Weise nach der Sonne orientieren. Mit Hilfe einer circadianen Uhr konnte ein Organismus auch die Tageslänge (oder Nachtlänge) bestimmen und damit die Jahreszeit ableiten (siehe Kapitel 13).

Wichtiger war wahrscheinlich der Schutz vor den Schädlichen Lichtstrahlen: Mit zunehmender Konzentration des Sauerstoffs in der Atmosphäre wurden Gene und DNA Replikation leicht durch Photo-Oxidation geschädigt. Die Organismen konnten das verhindern, indem der angeregte Zustand gequencht wurde. Oder aber Licht-empfindliche Prozesse wurden auf die Dunkelperiode beschränkt. Der Besitz eines Tagesrhythmus würde also einen entscheidenden Vorteil bieten (Pittendrigh (1966), Pittendrigh (1965)). Andererseits könnten Rhythmen nach Kippert (1987) auch wichtig gewesen sein, weil die Symbiose eines Prokaryonten und seines Wirts die Koordination des Stoffwechsels beider Partner brauchte. Auch die Teilung der Partner musste synchronisiert werden. Das wurde durch einen Oszillator zustande gebracht. Ca<sup>2+</sup> diente als intrazellulärer Signal-Überträger in diesen Prozessen (Abbildung 18.7). Die Synchronisation dieses Oszillators durch den Licht-Dunkel-Wechsel und durch Temperaturänderungen erfolgte erst spät im Laufe der Evolution.

not found!

Abbildung 18.7: Koordination zwischen Endocytobiont und Wirtszelle auf drei Ebenen, um ausreichende Integration zu erreichen. Epigenetische Koordination nötig für zum Beispiel multimere Proteine, die von verschiedenen Genomen gemacht werden. Zeitliche Koordination wichtig für Harmonie zwischen Teilungsraten und -zeiten der Partner. Nach Kippert (1987). 282X/ kippert-model

## Kapitel 19

# Wie geht es weiter? Die Zukunft der Chronobiologie

Auf dem Gebiet der Chronobiologie wurde in letzter Zeit über eine ganze Reihe neuer und aufregender Befunde berichtet. Dazu gehören die Untersuchungen an circadianen Rhythmen bei Cyanobakterien. Sie werfen auch ein neues Licht auf die Evolution circadianer Rhythmen. Diese Rhythmen sind offenbar viel früher entstanden, als man bisher glaubte. Mit den circadianen Mutanten bei diesen Prokaryonten und molekularbiologischen Methoden wird in den kommenden Jahren auch hier großer Fortschritt zu erwarten sein, so wie es bei den Standard-Objekten Drosophila, Neurospora, Chlamydomonas und Maus bereits geschehen ist. Die den circadianen Rhythmen zugrunde liegenden Mechanismen werden allmählich aufgeklärt werden, aber auch die peripheren Vorgänge, die von diesen Rhythmen kontrolliert werden. Modelle können dabei helfen, das circadiane System zu verstehen. Wahrscheinlich wird eine konzertierte und konzentrierte Anstrengung, ausgewählte circadiane Rhythmen aufzuklären, bald zu ersten Erfolgen führen. Besonders geeignet sind Minimalsysteme, die möglichst einfach sind. Einzeller und Prokarvonten bieten sich da an. Am vielversprechendsten ist es, Uhr-Mutanten zu verwenden und neue Techniken der Molekulargenetik einzusetzen, um in diesen Minimalsystemen den Mechanismus der circadianen Uhr aufzuklären.

Wenn die Teile der Uhr auf transkriptionaler und translationaler Ebene in diesem einen Fall bekannt sind, sollte es einfach sein, herauszufinden, ob in anderen Fällen die circadianen Uhren nach den gleichen Prinzipien funktionieren. Die Systematik und vielleicht sogar die Evolution circadianer Rhythmen könnte dann vielleicht aufgeklärt werden.

Besonders wichtig sind Fragen nach der Lokalisation der Zentren, die bei Tieren circadiane Rhythmen erzeugen. Wie viele solcher Zentren gibt es? Was sind die physiologischen und molekularbiologischen Mechanismen, nach denen sie funktionieren? Wie wird die circadiane Information kodiert und wie wirken sie auf die physiologischen Systeme, die sie steuern? Wie werden die circadianen Systeme synchronisiert? Wie sind die circadianen Zentren miteinander gekoppelt?

Die Chronobiologie wird in den nächsten Jahren auch weiterhin helfen, Fragen zu beantworten, die sich durch Schichtarbeit und Jetlag und durch medizinische Probleme wie zum Beispiel Schlafstörungen ergeben.

Wichtig für den Fortschritt auf diesem Gebiet sind meiner Meinung nach eine enge Zusammenarbeit und intensive Kommunikation zwischen den Forschern. Man kann dem Clock-Club beitreten, der am Ende eines Schwerpunkt-Programmes der Deutschen Forschungsgemeinschaft von den Teilnehmern beschlossen wurde (siehe clockclub moderator <clockclub-owner@yahoogroups.com>).

## Kapitel 20

# Spezialthemen

In diesem Kapitel befinden sich spezielle Themen, die sich auch für Seminare eignen. Für Vorschläge über weitere Themen würde ich mich freuen.

Beschwerde-Kasten: Dieses Kapitel braucht Ihre Mithilfe! Einige der Themen sollen zusätzliche Informationen für die bisherigen Kapitel des Buches geben, andere einen Einblick in Gebiete geben, die bisher nicht behandelt wurden.

### 20.1 Circumnutationen bei Pflanzen

Wenn Pflanzen aufwärts wachsen, strecken sie sich normalerweise nicht gleichmäßig. Vielmehr wandert die Wachstumszone. Von oben gesehen zeigt die Spitze des Stängels kreisförmige, elliptische oder pendelförmige Bewegungen, von der Seite eine Helix. Bei Ranken von klimmenden Pflanzen sind diese Circumnutationen besonders ausgeprägt. Die Pflanzen versuchen auf diese Weise einen Halt zu finden. Circumnutationen sind auch bei nicht-klimmenden Pflanzen zu beobachten.- Sie kommen bei Dikotylen, Monokotylen, Gymnospermen und sogar unter Pilzen und Bakterien vor. Auch Wurzeln können nutieren ('root waving' Simmons et al. (1995)). Siehe Übersichten von Baillaud (1962b), Johnsson (1979), Brown (1993).

Circumnutationen sind immer mit Wachstum verbunden. Bei Wachstumsraten unter 0.5 mm pro Stunde hört bei Periploca graeca die Circumnutation auf (Melin (1975)). Die Periodenlänge der Circumnutationen ändert sich mit der Temperatur ( $Q_{10}$  von 2). Je nach dem Objekt liegt sie normalerweise zwischen 15 Minuten und 5 Stunden. Einige Arten haben Circumnutationen mit verschiedenen Frequenzen (Sicyos, Passiflora (Gradmann (1922)), Phaseolus (Heathcote (1966)), Arabidopsis (Schuster (1996))). Die Auslenkungen sind bei Arabidopsis nur Bruchteile von Millimetern, aber bei Hoya carnosa bis zu 1.5 Meter. Je nach Spezies und Oszillation gibt es Vorzugsrichtungen nach rechts oder links ('Chiralität'). Oszillationen mit unterschiedlichen Perioden können sich überlagern.

Im folgenden werden wir uns näher mit der Circumnutation von Arabidopsis thaliana beschäftigen. Wir versuchen, die Mechanismen zu verstehen, die diesen Circumnutation zu Grunde liegen.

Dazu müssen wir zuerst wissen, wie sich die Zellen strecken und die Zellwände wachsen. Arabidopsis thaliana Keimlinge strecken sich ziemlich kräftig, wenn sie im Dunkeln oder im Schwachlicht gehalten werden. Bereits im Keimling des Samens sind alle Zellen (etwa 20 übereinander) vorhanden, die nach der Keimung das Hypocotyl bilden. In den ersten drei



Abbildung 20.1: Streckung des Hypokotyls von Arabidopsis thaliana von der Samenkeimung bis zu einem 3.5 Tage alten Keimling im Dunkeln. Bildanalysemethode nach Neugebauer (2002). Die Html-Version zeigt das Strecken als Zeitraffer-Aufnahmen (ein Bild pro 4 Minuten). E011Nn/at-wa-hypo

Tagen nach dem Keimen strecken sich nur die unteren Zellen. Danach erfolgt das Strecken des Hypokotyls hauptsächlich im mittleren und oberen Teil des Hypokotyls, und zwar ohne Zellteilungen (Gendreau et al. (1997), Abbildung 20.1). Die Zellen werden aber während des Streckens polyploid: Der Chromosomensatz vervielfacht sich ohne Kern- und Zellteilung.

Wie strecken sich die Zellen? Die Wand der äußeren Hypokotylzellen ist ziemlich fest und gibt den Keimlingen Stabilität. Wenn sich die Zellen strecken, müssen ihre Wände erst gelockert werden. Danach können sich die Vakuolen der Zellen auf Grund ihres Turgordruckes vergrößern. Neues Material wird in die Wände eingelagert, die Zellen strecken sich und das Hypocotyl wird länger. Der Durchmesser der Zellen bleibt aber konstant. Das liegt an Mikrofibrillen der Zellulose: Sie sind nach dem Gürtelreifen-Prinzip kreisförmig angeordnet (siehe Abbildung 1.18). Die ZelluloseMikrofibrillen können während der Volumen-Zunahme der Zellen auseinander rutschen (Abbildung 20.2). Neue Zellulose-Fibrillen werden ringförmig eingefügt, ohne dass sich der Durchmesser der Zellen ändert.<sup>1</sup> Auf diese Weise führt die Volumen-Vergrößerung nur zu einer Streckung der Zellen. Das Hypokotyl kann möglichst rasch nach oben wachsen, um ans Licht zu kommen, das für die Pflanzen so wichtig ist.

Damit sich die Zellen strecken können, müssen sich Kontaktpunkte im Netzwerk der Zellwand lösen. Die Wand besteht nach einem Modell von Carpenter and X (1993) (Abbildung 20.2) aus drei miteinander verbundenen Netzen mit verschiedener Struktur. Sie verleihen der Wand Stärke, Flexibilität und die Fähigkeit, sich

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Oder das Zellwand-Material entfernt sich voneinander, indem die Mikrofibrillen aus einer transversalen in eine longitudinale Lage gebracht werden (Roelofsen (1965)).



Abbildung 20.3: Struktur und Aminosäure Sequenz des Expansins S1 von Kürbissen. Die folgenden Eigenschaften sind hervorgehoben: Ein hydrophobes Signalpeptid am Amino-Ende (links), eine zentrale Region (rot) mit acht konservierten Cysteinen. Einige von ihnen bilden wahrscheinlich intra-molekulare Brücken. Eine Region mit verschiedenen konservierten basischen Resten (grün). Eine Region am Carboxyl-Ende mit vier konservierten Tryptophanen (purpur). Diese Region ähnelt der Zellulose-Bindungs-Domäne von Bakterien (CBD). Hier lokalisierte Asparaginsäure-Reste bestimmen vielleicht das Säure-Optimum der Expansin-Aktivität. Nach Cosgrove (1996). E013/expansin



Abbildung 20.4: Die Zellwand wird durch Expansin (blau) gelockert, indem die Verbindungen zwischen den Zellulose-Mikrofibrillen (gelb) und den Hemizellulosen (blau, rot) gelöst wird. Die Mikrofibrillen können jetzt durch den Wanddruck auseinander geschoben werden, das Polymer 'kriecht'. Neue Zellulose-Mikrofibrillen werden an den Terminal-Komplexen gebildet und neue Hemizellulosen eingelagert und verknüpft (nicht gezeigt). Andere Wandkomponenten werden ebenfalls gestreckt (nicht gezeigt). Nach Cosgrove (1996). E014/zw-lockern



Abbildung 20.2: Multinetz-Modell der Zellwand nach Carpenter and X (n.d.). Von einem Keimling (a) ist ein Teil des Hypokotyls vergrößert gezeigt (b). Davon ist eine einzelne Zelle in (c) dargestellt. Ein kurzes Stück seiner Wand ist schematisch im ursprünglichen Zustand (d) und während der Wandstreckung gezeigt (e). Die Zellulose-Fibrillen werden durch Turgordruck der Vakuole und andere Ereignisse (siehe Abbildung 20.4) auseinander geschoben, bevor neue Zellulose-Fibrillen gebildet und eingebaut werden (von den Terminal-Komplexen in der Plasmamembran). Die Zellwand besteht aus drei Netzen (f): Eine wird durch Zellulose-Mikrofibrillen (30%) und Hemizellulosen (30%) gebildet, eine besteht aus einer Pektin-Matrix (35%), und eine ist aus Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen aufgebaut (1-5%), die als Struktur-Proteine fungieren. Enzyme, unter ihnen Expansin, spielen während der Wand-Streckung eine wichtige rolle. Nach Cosgrove (1993) und Cosgrove (1997). E012/multinet

zu vergrößern. Ein 'Zellwand loosening Faktor' ist dabei für die plastischen Eigenschaften der Zellwand verantwortlich. Nach der Säure-Wachstums-Hypothese von Hager et al. (1971) sollten das Protonen sein. Plasmamembrangebundene ATPasen werden durch Auxin aktiviert und ihre Konzentration erhöht. Sie pumpen Protonen in die Zellwand, die auf diese Weise plastisch werden. Inzwischen wurde jedoch gezeigt, dass Expansin, ein Protein (Abbildung 20.3), die Wände lockert (C and X (1997)). Wie das vor sich gehen könnte, ist in Abbildung 20.4 gezeigt. Je nachdem, ob in den Zellen Rezeptoren für Expansin aktiv sind oder nicht, reagieren die Zellen auf dieses Protein.

Welche Rolle dabei Auxin spielt, ist noch nicht genau bekannt. Das Strecken wird durch Auxin gefördert<sup>2</sup>. Der Transport läuft über das Phloem oder polar über Parenchym und Xylem. Die Transportgeschwindigkeit beträgt 5 bis 20 mm pro Stunden. Im Plasmalemma der Zellen wird ein Carrier für den Auxintransport benötigt.

Wie entstehen Circumnutationen? Wir sahen, dass sich die Hypokotylzellen nicht einheitlich strecken. Zu Beginn der Keimung strecken sich die unteren Zellen (sie sind zu dieser Zeit auf Expansin empfindlich). Später verlängern sich die Zellen im mittleren und oberen Teil des Hypokotyls. Die unteren Zellen sind jetzt unempfindlich auf Expansin. Aber selbst in der gleichen Wachstumszone erfolgt die Streckung nicht einheitlich. Vielmehr streckt sich eine Seite des Hypokotyls, und die Nachbarzellen fol-

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Auxin hat eine schnelle Wirkung, die bereits nach 8 Minuten beginnt und ihr Maximum nach einer Stunde erreicht. 2-3 Stunden später ist diese Wirkung vorbei. Auxin erniedrigt den pH, aktiviert die Phospholipase, setzt eine Kaskade von Phosphorylierungen in Gang und aktiviert Proteinkinasen.

Daneben hat Auxin auch einen langsamen Effekt. Es induziert Prozesse, die für die Streckung nötig sind. Osmoregulation und Gen-Aktivierungen für den Proteinund Kohlenhydrat-Syntheseweg gehören dazu.

Eigenschaft	SPN	LPN			
Periodenlänge	20-60 min	1-8 h			
Abweichung	40 min	> 7 h			
Verteilung	ein Gipfel	mehrere Gipfel			
Vorzugsrichtung	im Uhrzeigersinn	gegen Uhrzeigersinn			
Korrelation mit Wachstum	starkes Wachstum	langsames Wachstum			

Tabelle 20.1: Verschiedene Eigenschaften der Circumnutationen

gen allmählich mit eigenem Strecken. Eine Welle des Streckens läuft um die betreffende Hypokotylregion herum. Als Folge davon dreht sich das Hypocotyl. Auf der Organ-Ebene kommt es durch periodische Änderungen des osmotischen Potentials der Epidermiszellen zu plastischen und elastischen Längenänderungen. Im Teil, in dem sich das Hypocotyl biegt, ist  $K^+$ unsymmetrisch und ringförmig verteilt (Abbildung 20.5, Phaseolus, Badot (1987)). Wachstum läuft somit in Zeit und Raum in Schüben ab. Das Hypokotyl von Arabidopsis thaliana zeigt ein ganzes Spektrum von Circumnutationen: Es besteht aus 'short period nutations' (SPN) mit Periodenlängen von etwa 30 Minuten, aus 'long period nutations' (LPN) mit Periodenlängen im Stunden-Bereich, und gelegentlich aus 'ultrashort period nutations' (uSPN) von etwa 15 Minuten. SPN und LPN unterscheiden sich durch eine Reihe von Eigenschaften, die in Tabelle 20.1 zusammengestellt sind. in ihrer Reaktion auf Licht und Ethylen. Es wird deshalb vermutet, dass verschiedene Mechanismen verantwortlich sind und/oder verschiedene Teile des Hypokotyls daran beteiligt sind. SPN's treten vor allem nach der Keimung auf. wenn das Hypocotyl sich zu strecken beginnt (Schuster (1996)). In den ersten drei Tagen strecken sich nur die unteren Zellen (Gendreau et al. (1997)). Vielleicht entstehen die SPN's durch die kreisförmige Streckung der unteren Hypokotylzellen, während die LPN's



Abbildung 20.5: Im Teil des Hypokotyls von Phaseolus, in dem es sich dreht, ist $K^+$  asymmetrisch und ringförmig verteilt. Nach Badot (1987). E015/k-verteilung-hyp

zustande kommen, wenn sich später die Zellen im mittleren Teil des Hypokotyls strecken. Das müsste mit Markierungen der verschiedenen Teile des Hypokotyls zu prüfen sein.

Das Strecken des Hypokotyls von Arabidopsis thaliana steht ferner unter circadianer Kontrolle, wie sich unter Konstantbedingungen zeigt. Es gibt Zeiten mit geringen Wachstumsraten und solche mit hohen. Da ultradiane Circumnutationen nur während des Wachstums entstehen, müssen sie durch circadiane Rhythmen moduliert werden: Die Amplituden der Circumnutationen steigen dementsprechend an, erreichen ein Maximum und verschwinden wieder. Nach einem circadianen Zyklus erscheinen sie wieder. Bei Arabidopsis thaliana gibt es weitere Ereignisse, die circadian kontrolliert werden (Millar (1998)).

Wachstum und Circumnutationen von Arabidopsis thaliana (und anderen Pflanzen) können mit Bildanalyse-Verfahren registriert und analysiert werden. Dazu kann man die Keimlinge mit zwei Video-Kameras von der Seite oder von oben aufnehmen und in regelmäßigen Abständen Bilder aufnehmen und speichern. Sie können mit speziellen Verfahren und Programmen ausgewertet werden (Neugebauer (2002)).

### 20.2 Biologische Bedeutung des REM-Schlafes

REM-Schlaf gibt es nur bei Säugern und Vögeln. Besonders gut entwickelt ist er bei hoch entwickelten Säugern. Reptilien haben keinen REM-Schlaf. Im Gegensatz zu Mensch und Affen haben kleine Säuger und Vögel nur zwei Schlafstadien. Das eine ähnelt dem SWS4, das andere dem REM. Der Ameisenigel ist der einzige Säuger, der keinen REM-Schlaf besitzt.

Der paradoxe Schlaf oder REM-Schlaf scheint eine primitive Form des Schlafes zu sein. Der Tiefschlaf dagegen ist eine phylogenetisch neue Erfindung. Der REM-Schlaf wird noch zum größten Teil durch circadiane Faktoren kontrolliert (zusätzlich zur homöostatischen Kontrolle, Wurts and Edgar (2000)) und reguliert nur grob. Schlafentzug ist zum Beispiel in der Regel ohne Effekt auf den REM-Schlaf. Erst bei sehr massivem Entzug verlängert er sich. Die Gehirnareale im Stammhirn, die für den REM-Schlaf zuständig sind, sind phylogenetisch sehr alt. REM Schlaf tritt bereits in einem frühen Stadium der Entwicklung auf (siehe Seite 426).

Jeder Mensch träumt in jeder Nacht mehrfach in regelmäßigen Zyklen. Allerdings vergessen wir Träume schnell: Ein REM-Schlaf-Traum wird nach 8 Minuten nicht mehr erinnert. Aus diesem Grunde erinnern wir uns vor allem an Träume am Morgen. Die physiologische Intensität der REM-Phasen nimmt mit dem Verlauf der Nacht zu und deshalb sind diese Träume diejenigen, die am emotionalsten sind und oft visuellen Inhalt haben.

Die Augenbewegungen können als Indikator für den REM-Schlaf dienen. Neuronale Spike-Mechanismen (PGO-spikes) laufen parallel zu den Träumen ab, besonders bei ereignisreichen Inhalten. Wahrscheinlich verursachen sie REM und die Träume. Auch Penis-Erektionen, die zu Beginn des REM-Schlafs auftreten, werden wohl durch PGO's verursacht. Träume laufen aber nicht nur im REM-Schlaf ab, wie früher geglaubt wurde, sondern auch im Tiefschlaf.

Wie entsteht der REM-Schlaf und wo ist er lokalisiert? Nach Hess (n.d.) gibt es bestimmte Hirnbezirke, parasympathische und symphatische, deren Reizung (4-6Hz, 2.5-3.5V) Schlaf/Wachen induziert. Der Thalamus und Hypothalamus, aber auch andere Zentren, sogar periphere Nerven sind dabei beteiligt. Hypothalamus-Läsionen führen bei der Katze zum Schlaf. Ein zweites Schlafzentrum in der Pons scheint für den REM-Schlaf verantwortlich zu sein. Schließlich gibt es noch ein mesencephales Wachzentrum und antagonistische Zentren.

Jouvet (1965) konnte durch Pons-Läsionen den REM-Schlaf der Katze so beeinflussen, dass die Hemmung der großen Muskeln (Atonie) aufgehoben wurde und die Tiere 'ihr Verhalten im Traumschlaf auslebten'. Juvet glaubte, dass der REM-Schlaf zur Programmierung artspezifischer Verhaltensweisen und zum Üben dient. Deshalb funktionieren diese Verhaltensweisen auch gleich, wenn sie zum ersten Mal ablaufen. Die neuronalen Schaltungen für dieses Instinktverhalten würden demnach im REM-Stadium organisiert werden. Bei Kaltblütern sind diese Verhaltensweisen schon vorprogrammiert und deshalb brauchen diese keinen REM-Schlaf. Dagegen spricht allerdings, dass diese Verhaltensmuster sich auch anders entwickeln können, zum Beispiel im Spiel. Außerdem hängt das Verhalten von der Lage und Größe der Läsion ab, die die Atonie aufhebt. Aggressives Verhalten wird erzeugt, wenn die Läsion mehr rostroventral ins Mittelhirn verlängert wird. Die Tiere sind dann aber auch im Wachzustand aggressiv. Es handelt sich also um eine nichtspezifische Änderung des Verhaltens. Wichtig ist aber der Befund, dass im REM-Schlaf Atonie herrscht und diese durch Läsionen aufgehoben werden kann.

Was ist die biologische Bedeutung des REM-Schlafes? Man kann einen großen Teil des REM-Schlafes entziehen, indem man Versuchspersonen weckt, wenn der REM-Schlaf beginnt. Auf den SWS hat das keinen Einfluss. Der REM-Schlaf ist in den Nächten nach dem Entzug früher, länger und häufiger. Es gibt keine ernsthaften psychologischen Störungen, selbst nicht nach 16 Tagen REM-Schlaf-Entzug. Der REM-Schlaf 'rebound' zeigt aber, dass dieses Schlafstadium physiologisch notwendig ist. Es zeigt auch, dass Träumen wichtig ist, weil Träume während dieses Stadiums stattfinden (aber nicht ausschließlich, siehe Abschnitt 20.7). Die Bedeutung des Traumes ist aber weitgehend unbekannt. Chronische Behandlung bestimmter Krankheiten mit Monoaminoxydase-Hemmstoffen unterbindet REM-Schlaf und Träumen für Jahre. Sie hat aber keine nachteiligen psychologischen Konsequenzen (diskutiert von Jouvet (1994)).

Was passiert im REM-Schlaf? Es gibt darüber verschiedene Hypothesen. Nach einer werden in diesem Stadium bestimmte Vorgänge im Gehirn programmiert, zum Beispiel die Entwicklung von Instinkthandlungen oder das Einüben von Abläufen. Nach einer anderen Hypothese finden in diesem Stadium Erholungsvorgänge statt. Nach einer weiteren hat der REM- Schlaf eine Wächter-Funktion: Die Umgebung wird periodisch überwacht. Das ist bei Vögeln bekannt. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein Relikt aus der Reptilienzeit und ist bei Säugern ohne Funktion. Leider sind diese Hypothesen schwierig zu testen.

Hennevin and X (1995) behaupten, der REM Schlaf konsolidiere Gedächtnisleistungen. Erfahrungen werden in das Gedächtnis übernommen. Der Hauptunterschied zwischen dem Zustand des Wachseins und dem REM Zustand ist die unterschiedliche Gewichtung sensorischer Afferenzen kognitiver Bilder. Sonst sind die beiden Stadien äquivalente Zustände des Gehirns, die durch thalamo-corticale Rückkopplung zustande kommt.

Nach Roffwarg (1966) spielt der REM-Schlaf für das sich entwickelnde Gehirn etwa die gleiche Rolle wie physische Anstrengung für die Entwicklung der Muskeln. Im REM-Schlaf werden neuronale Kreise stark aktiviert. In diesem Stadium wird mehr Sauerstoff im Gehirn verbraucht als während physischer oder mentaler Übungen im Wachzustand. Es wurde deshalb vermutet, dass der REM-Schlaf für die Entwicklung des Gehirns wichtig ist (Goldstein and X (1992)).

Crick and Mitchison (1984) spekulieren über die Funktion des REM Schlafes. Sie meinen, träumen während des REM Schlafes sei ein Weg zum aktiven Verlernen. Unnötige oder schädliche Informationen werden in einer Art selbst-Reinigungs-Prozess beseitigt. Die Trauminhalte sind mehr oder weniger Produkte des Zufalls. Es ist deshalb besser, Träume zu vergessen. Sonst würde man sie leicht für wahr halten, was beim Verrücktsein vorkommt.

Braun et al. (1998) schlagen vor, dass während des REM Schlafes die Übertragung visueller Informationen zwischen den visuellen Cortices und dem limbischen System aktiviert werden, die Übertragung solcher Informationen zu den prä-frontalen Assoziations-Cortices aber nicht. Dadurch operieren die extrastriaten Cortices und die paralimbischen Gebiete, zu denen sie projizieren, wie ein geschlossenes System, das von frontalen Regionen entkoppelt ist. Das Gehirn erreicht dadurch, dass ein inter-optisches Netzwerk selektiv aktiv ist. Es ist von primären und heteromodal assoziierten Gebieten auf beiden Seiten der visuellen Hierarchie dissoziiert und damit von der äußeren Welt.

Der Cortex von Vögeln und Säugern (mit Ausnahme von Eier legenden Ameisenigeln und Verwandten) besteht aus einem Netzwerk von Zellen die sich auf vielfältige Weise gegenseitig stimulieren. Während der Speicherung verschiedener Gedächtnisinhalte können parasitische Bedingungen auftreten:

- Wenn Netze verbunden werden, die nichts oder kaum etwas miteinander zu tun haben, entstehen bizarre Assoziationen oder Phantasien.
- Wenn viele individuelle Netze stimuliert werden, wird damit ein einziges großes Netz gereizt. Es kommt zu Einbildungen und fixen Ideen.
- Wenn Signale zu Stimulation führen, es aber eigentlich nicht sollten, ergeben sich Halluzinationen.

Epilepsie und Migräne könnten das Ergebnis solcher parasitischen Bedingungen sein

### 20.3 Ontogenie des circadianen Systems beim Menschen

Der Temperaturrhythmus ist bei der Geburt noch schwach ausgeprägt. Er entwickelt sich im ersten Lebensjahr. Wann er die Amplitude des Erwachsenen erreicht, ist unbekannt. Im Alter gibt es Defizite der Temperatur-Regulation. Außerdem verkürzt sich die Periodenlänge von 25.1 auf 24.5 Stunden. Auch die Phasenbeziehung ändert sich und die Amplitude wird geringer.

Das Schlafmuster des Menschen verändert sich während seiner Entwicklung stark. Bei Neugeborenen ist der Schlaf polyphasisch, beim Kind biphasisch und beim Erwachsenen monophasisch. Er ist auf den Tag-Nacht-Zyklus synchronisiert.

Neugeborene schlafen 16 Stunden des Tages. Sie zeigen einen Ruhe-Aktivitäts-Zyklus von 50-60 Minuten. Er wird relativ bald mit einem 3-4 Stunden Verdauungszyklus gekoppelt (A21 (n.d.)). Schließlich entwickelt sich mit 18 Wochen ein 24-Stunden Rhythmus<sup>3</sup> Ab 6 Monaten beträgt der Schlaf 10 Stunden, der Tagesschlaf wird seltener. Mit zwei Jahren schlafen Kinder 13-14 Stunden pro Tag. Das Schlafbedürfnis sinkt während der Jugendzeit und im Erwachsenenalter ständig, bleibt dann in den mittleren Jahren konstant, um im Alter wieder abzunehmen. Die stärksten Änderungen erfolgen im REM-Schlaf und im Stadium 4 des SWS. Der REM-Schlaf findet bereits bei Föten im Uterus statt. Frühgeburten sind 80% (10 Wochen zu früh), 60-65% (2-4 Wochen zu früh) bzw 50% (zur normalen Zeit Geborene) des gesamten Schlafs im REM-Zustand. Mit 2 Jahren sinkt der Wert auf 30-35% und mit 10 Jahren auf 25%. Dieser Wert wird bis zum 70. bis 80. Lebensjahr beibehalten. Das Stadium 4 des SWS sinkt exponentiell während der Entwicklungsjahre und den mittleren Jahren. Mit 60 Jahren verschwindet dieses Stadium oft völlig, wobei häufiges spontanes Erwachen und biphasischer Schlaf damit oft einhergeht.

Weitere Arbeiten in Davis (1981), Meier-Koll et al. (1978), Meier-Koll (1979), Meier-Koll

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Hier gibt es vielleicht auch kulturelle oder geographische Unterschiede. Bei japanischen und indischen Säuglingen ist der Tagesrhythmus des Schlafes schon unmittelbar nach der Geburt zu erkennen (Tomioka and Tomioka (1991), Marimuthu (n.d.)).

(1992), Glotzbach et al. (1997), Roquefeuil et al. (1993)

### 20.4 Chronobiologischer Phasentyp

Diese Liste besteht aus Fragen, die sich auf Ihre Aktivitäten beziehen und darauf, wie wach Sie sich morgens und abends fühlen. Wenn Sie die Fragen 1 bis 4 beantworten: Gehen Sie davon aus, sie können tagsüber acht Stunden zu Zeiten arbeiten, die Sie selbst wählen. Beantworten Sie alle Fragen. Kreuzen Sie nur eine Antwort an. Seien Sie ehrlich.

- 1. Wie schwierig wäre es für Sie, immer erst um 1:00 Uhr nachts ins Bett zu gehen
  - (4) Sehr schwierig. Ich würde sehr lange schrecklich müde sein
  - (3) Ziemlich schwierig. Ich würde mich eine Zeit lang müde fühlen
  - (2) Nicht schwierig. Ich würde mich ein wenig müde fühlen
  - (1) Nicht schwierig, kein Problem
- 2. Wie schwierig wäre es für Sie, morgens um 6:00 Uhr aufzustehen?
  - (1) Sehr schwierig. Ich würde sehr lange schrecklich müde sein
  - (2) Ziemlich schwierig. Ich würde mich eine Zeit lang müde fühlen
  - (3) Nicht schwierig. Ich würde mich ein wenig müde fühlen
  - (4) Nicht schwierig, kein Problem
- 3. Sie haben sich für ein Fitness-Training entschlossen. Ihr/e Freund/in macht den Vorschlag, zweimal pro Woche zu trainieren. Für ihn/sie ist die beste Zeit morgens von 7 bis 8 Uhr. Wie wäre das für Sie?

- (4) Wäre optimal
- (3) Würde gehen
- (2) Würde mir schwer fallen, später wäre mir lieber
- (1) Würde mir zu schwer fallen
- 4. Sie haben sich für ein Fitness-Training entschlossen. Ihr/e Freund/in macht den Vorschlag, zweimal pro Woche zu trainieren. Für ihn/sie ist die beste Zeit abends von 23 bis 24 Uhr. Wie wäre das für Sie?
  - (1) Wäre optimal
  - (2) Würde gehen
  - (3) Würde mir schwer fallen, später wäre mir lieber
  - (4) Würde mir zu schwer fallen
- Markieren Sie die Zeitspanne, zu der Sie gewöhnlich zu Bett gehen. Die oberste Zeile gibt ein Beispiel für jemanden, der gewöhnlich zwischen 23:00 und 24:00 ins Bett geht.

Beispiel					_						
20	21	22		23		24		01	02		
(5) ->		(4)	(4) ->		(3) ->		(2) ->		(1) ->		

6. Markieren Sie die Zeitspanne, zu der Sie *gewöhnlich* aufstehen.

05	06	07		08		09		10		11	
(5) ->		(4)	(4) ->		(3)->		(2) ->		(1) ->		

- 7. Sind Sie eine morgen- oder abendaktive Person?
  - (5) ausgesprochen morgenaktiv
  - (4) mäßig morgenaktiv
  - (3) weder/noch

- (2) mäßig abendaktiv
- (1) ausgesprochen abendaktiv

Die in Klammern angegebenen Werte sind zu addieren (in dem bei Frage 5 angegebenen Beispiel würde man (4) und nicht (5) verwenden). Aus der Summe ergibt sich der chronobiologische Phasentyp:

- 7-10 extremer Abendtyp
- 11-14 Abendtyp
- 15-21 Indifferenztyp
- 22-25 Morgentyp
- 26-31 extremer Morgentyp

### 20.5 Circadiane Rhythmen bei Blinden

Hier sind einige Originalarbeiten neueren Datums zusammengestellt.

Zu Beginn der Untersuchungen des tagesperiodischen Systems des Menschen wurde geglaubt, dass der Licht-Dunkel-Wechsel bei der Synchronisation keine Bedeutung hat (Untersuchungen in einem unterirdischen Wohnraum in Erling-Andechs südlich von München). Später zeigte sich aber, dass der Grund dafür die relativ niedrigen Lichtintensitäten während der Lichtzeiten in diesen Räumen war. Wird die Intensität auf über 2500 Lux erhöht, wird wie bei anderen Vertebraten der Tagesrhythmus synchronisiert. Also spielt auch beim Menschen der Licht-Dunkel-Wechsel eine wichtige Rolle bei der Synchronisation circadianer Rhythmen. Allerdings sind höhere Intensitäten nötig als bei den meisten daraufhin untersuchten Tieren<sup>4</sup> Ein weiterer Hinweis darauf sind Studien des circadianen Systems von Blinden.

Blinde, die keinerlei Licht mehr wahrnehmen können, zeigen in vielen Fällen Freilauf ihrer Tagesrhythmen (Miles et al. (1977)). Das führt oft zu Schlafstörungen. So hatten von 50 untersuchten Blinden 38 Schlafschwierigkeiten. Bei 20 waren diese Störungen zyklischer Art, eine Person zeigte Freilauf mit einer Periodenlänge von 24.9 Stunden. Solche Störungen treten besonders dann auf, wenn der innere Rhythmus durch seinen Freilauf nicht mehr im Takt mit dem Tag-Nacht-Wechsel ist. Der Tagesrhythmus lässt sich bestimmen, indem die endogene Melatonin-Sekretion zu verschiedenen Zeiten des Tages bestimmt wird (als Abbauprodukt im Harn)<sup>5</sup> Der Melatonin-Rhythmus ist relativ unempfindlich auf Störungen. Deshalb lässt sich damit feststellen, ob eine blinde Person auf den Tag synchronisiert ist oder Freilauf zeigt.

Einige Blinde sind normal synchronisiert, möglicherweise durch Reste intakter retinohypothalamischer Verbindungen<sup>6</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Sogar unter konstanten Schwachlicht-Bedingungen (8 Lux) zeigte eine Gruppe von sechs Personen Freilauf der Körpertemperatur-, Aktivitäts- und Schlaf-Wach-Rhythmen, obwohl sie die Tageszeit kannten (Middleton and X (n.d.)). Das zeigt, dass der Licht-Dunkel-Zyklus für die Synchronisation circadianer Rhythmen wichtig ist.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Das Pinealorgan gibt während der Nacht Melatonin diurnal ab. Die Sekretionsdauer hängt von der Länge der Dunkelperiode ab. Säuger erhalten über Melatonin photoperiodische Informationen, um ihre Jahresrhythmen zu synchronisieren. Die Bedeutung des Melatonins in der circadianen Physiologie der Säuger ist weniger klar (siehe Seite 434).

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>Der Melatonin-Rhythmus wurde bei 49 Blinden registriert. 19 davon konnten Licht wahrnehmen, 30 keins. Bei den meisten der ersten Gruppe (14) war der Rhythmus auf den 24-Stunden-Tag synchronisiert. Bei der zweiten Gruppe waren die meisten nicht synchronisiert (23). 17 dieser Gruppe hatten Freilauf, 5 waren ungewöhnlich synchronisiert (Lockley et al. (1998)).

Exogenes Melatonin kann circadiane Rhythmen von Nagern und vom Menschen in ihrer Phase verschieben und in einigen Fällen synchronisieren, wenn es täglich zu einem bestimmten Zeitpunkt (vor Schlafbeginn) verabreicht wird. Es kann in einigen Fällen auch bei Schlafstörungen von Blinden erfolgreich eingesetzt werden, um den Schlaf zu synchronisieren (Arendt (1997)). Allerdings wirkt es weniger stark als endogenes Melatonin. Die Synchronisation anderer circadianer Rhythmen durch Melatonin ist aber sehr selten (Arendt et al. (1992)).

### 20.6 Kontrolle der Körpertemperatur bei Wirbeltieren

Die Körpertemperatur der Fische liegt normalerweise nur etwas über der Wassertemperatur. Ausnahmen sind manche Fische mit warmem Körper wie Thunfische und bestimmte Haie. Bei ihnen gibt es ein Gegenstrom-Gefäßsystem in den Muskeln, welches die Wärme fängt, die bei der Muskelaktivität entsteht. Die Körpertemperatur kann dadurch bis zu 21<sup>0</sup>C über der Wassertemperatur liegen. Beim Blauflossen-Thunfisch sind auch die Augen und das Hirn wärmer. Kontrollierter Wärmeaustausch erhöht die Leistungsfähigkeit der Fische und die Toleranz gegenüber unterschiedlichen Wassertemperaturen. So können Thunfische in Wassertemperaturen von  $5^0$  bis  $30^0$ C schwimmen. Sie können in 50 Tagen bis zu 6700 km zurücklegen. Dabei können sie für kurze Zeit eine Geschwindigkeit von 70 km pro Stunde haben.

Bei Landtieren können die Temperaturunterschiede sehr viel stärker sein. So beträgt die Temperatur am Lena Fluss in Russland im Sommer bis zu  $31^0$ , im Winter bis zu  $-71^0$ C.

Amphibien suchen bei hoher Lufttemperatur Plätze mit niedrigerer Temperatur auf, kühlen den Körper durch Verdunstung oder gehen ins Wasser.

Reptilien bevorzugen am Tage wärmere, während der Nacht kühlere Plätze. Im Winter suchen sie geschützte Plätze auf.

Säuger und Vögel haben eine mehr oder weniger gleich bleibende Körpertemperatur. Trotz stark schwankender Temperatur der Umwelt wird sie auf wenige Grade genau konstant gehalten (Homöostasie). Durch erhöhten Stoffwechsel wird endotherme Wärme erzeugt. Zusätzlich erhöht das Fell die thermische Isolation. Sie ist bei Huskies so gut, dass sie noch bei  $-30^{0}$ C im Freien schlafen können, ohne den Stoffwechsel merklich zu erhöhen. Ferner können sich Tiere gegen die Umwelt isolieren, indem sie Gänge anlegen, unterirdische Nester bauen und Futtervorrat anlegen.

Besonders wichtig ist bei homöothermen Tieren eine konstante Hirn-Temperatur. Die Körpertemperatur einer Antilope kann bis zu  $44^{0}$ C steigen, die Hirn-Temperatur übersteigt aber nicht  $40.5^{0}$ C. Dafür sorgt ein besonderer Wärmeaustausch-Mechanismus (Taylor und Lyman 1972). Die Temperaturregulation setzt ein, wenn die Hypothalamus-Temperatur um  $0.5^{0}$ C vom Sollwert abweicht. Auch im Torpor oder Winterschlaf findet diese Regulation statt, aber mit einem anderen Sollwert. Im REM Schlaf findet keine Temperatur-Regulation statt. Im SWS liegt der Sollwert der Temperatur-Regulation um  $2^{0}$ C niedriger als im Wachzustand.

Was hat die Homöothermie für Vorteile? Die Tiere sind dadurch viel ausdauernder und auch zu kühlen Tages- oder Jahreszeiten sofort reaktionsfähig. Sie erkaufen sich allerdings diesen Vorteil durch einen doppelt so hohen Energiebedarf. Eine weitere Frage ist, warum Vögel und Säuger eine so hohe Körpertemperatur halten. Wahrscheinlich war zur Zeit, als die Säuger entstanden, die Wärmeabgabe der wichtigste Grund: Bei hoher Körpertemperatur kann auch bei hoher Außentemperatur noch durch Verdunstungskälte (Hecheln, Schwitzen) Wärme abgegeben werden.

Die physiologischen Grundlagen der Temperaturregulation und der Homöostase werden im folgenden kurz vorgestellt (für Übersichten siehe Bligh (1973), Cabanac (1975), Cossins (1987), Hensel (1981)).

#### 20.6.1 Temperaturregulation homöothermer Tiere

Temperaturkonstanz bedeutet, dass Wärmeproduktion und Wärmeverlust sich die Waage halten (Bligh (1973), Boulant (1981) und Textbücher über Physiologie wie zum Beispiel Kandel and Schwartz (1991)). Wärme wird vor allem im Stoffwechsel produziert und kann bei hoher Aktivität um das 10 fache steigen. Deshalb sind die Mechanismen sehr wichtig, die Wärme abgeben. Wärmeabgabe ist stark von äußeren Bedingungen wie Temperatur und Wind abhängig. Es gibt drei verschiedene Mechanismen der Wärmeabgabe:

- 1. Wärmekonduktion
- 2. Wärmeabstrahlung
- 3. Verdunstungskälte erzeugen.

Wärmekonduktion und Wärmeabstrahlung ist nur bei kühlerer Umgebung möglich. Besonders wirksam ist die Konvektion, bei der die Strömung natürlich (Thermik) oder erzwungen (Wind) ist. Der 300 K warme Körper strahlt unabhängig von Haut- und Fellfarbe<sup>7</sup>. Die Verdunstungswärme ist für die Kühlung des Körpers am wichtigsten. Sie wird durch Schwitzen und Hecheln ausgenutzt. Für 1g Wasser beträgt die Wärmeabgabe 580 Cal (ca. 140 J). Im Wärmegleichgewicht wird die Wärmeproduktion des Stoffwechsels (beim ruhenden Menschen 70 kcal pro Stunde) durch die Summe der drei Wärmeabgabemechanismen ausgeglichen.

Die Wärmeproduktion verläuft zu 56% in den Organen der Brust und des Abdomens, obwohl diese nur 6% der Körpermasse ausmachen. Die Wärmeproduktion geschieht also hauptsächlich im Kern des Körpers und nicht in der Peripherie (Haut, Muskeln). Durch Muskelarbeit wird der Stoffwechsel und damit die Wärmeproduktion um bis zum zehnfachen Betrag erhöht. Um die 70 kcal Wärme des ruhenden Menschen durch Verdunstung abzuleiten, würden 120 ml Wasser genügen.

Wüstentiere besitzen besondere Mechanismen für die Wärmeableitung. Außerdem tolerieren sie mehr Wärmespeicherung (Kamel: 2900 kcal, das entspricht 5 Liter Wasser). Der Temperaturgradient ist dann entsprechend geringer und es ist nur 1/3 des Wassers zum Kühlen nötig. Das Fell isoliert zusätzlich gegen Wärme und erspart 50% Wasser. Im Endeffekt kann ein Kamel so 6-8 Tage dürsten. Es trinkt dann 1/3 seines Körpergewichtes. Beim Kamel ist die Körpertemperatur am Tag um 2<sup>o</sup>C höher als in der Nacht. Bei Wassermangel ist die Differenz  $6^{o}$ C. Auf diese Weise wird Wasser und Energie gespart.

Wie sieht es nun mit der Kontrolle der Körpertemperatur aus (Bligh (1973))? Die Oberfläche des Körpers durchläuft relativ hohe Temperaturdifferenzen, während sie im Kern des Körpers nur gering sind. Ziel ist, die Körpertemperatur nicht zu stark vom Sollwert abweichen zu lassen. Dafür gibt es zwei Kontrollsysteme:

1. Thermale Hautrezeptoren in der Körperschale: die erste Verteidigungslinie gegen Kälte und Wärme. Es handelt sich um eine Breitbandkontrolle. Durch sie wird die

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup>Die Farbe ist allerdings für die Strahlungsaufnahme sichtbaren Lichtes wichtig (wobei dunkle Hautfarbe mehr sichtbare Strahlung absorbiert, aber andererseits vor UV schützt.

periphere Zirkulation durch den vasomotorischen Tonus beeinflusst (Verengung und Erweiterung der Gefäße).

2. Thermorezeptoren im Kern des Körpers (Hypothalamus). Sie regulieren das Schwitzen oder Kältezittern und stellen eine weitere Verteidigungslinie gegen Kälte und Wärme dar. Es handelt sich hier um eine Schmalbandkontrolle.

In Abbildung 20.6 ist dieses Kontrollsystem dargestellt. Für Untersuchungen wird die Körpertemperatur mit Sensoren gemessen, die ihre Signale über Kabel oder Radiosender (intraperitoneal implantiert) weiterleiten. Auch Infrarot-Pyrometer werden verwendet. Die Rektaltemperatur wird standardmäßig benutzt, aber auch die Tympanaltemperatur weicht nicht mehr als  $0.2^{\circ}$ C von der Körpertemperatur ab (an Personen gemessen, die Kälte ausgesetzt wurden). Bei der Analyse der erhaltenen Zeitreihen werden meistens Periodogramme und Frequenz-Histogramme benutzt.

### 20.7 Was ist Schlaf?

Phasen von Aktivität und Ruhe folgen nicht nur bei Vertebraten aufeinander, sondern auch bei niederen Tieren wie Mollusken und Insekten und sogar bei Einzellern. Diese Ruhephasen bei niederen Tieren könnten Vorläufer des Schlaf-Wach-Rhythmus bei Vertebraten sein. Sie stehen normalerweise unter circadianer Kontrolle. Nach Borbely (1982) ist diese circadiane Kontrolle der Ruhephase zu rigide. Deshalb wird von höheren Tieren ein spezieller Prozess S verwendet, der Schlaf je nach den äußeren Bedingungen viel flexibler kontrolliert als der Ruhe-Aktivitäts-Zyklus.

Pieron (1913) definierte Schlaf als einen notwendigen Prozess, der rhythmisch mehr oder weniger unabhängig von äußeren Bedingungen auftritt. In diesem Stadium sind sensorische und motorische Interaktionen des Gehirns mit der Umwelt unterbrochen. Wir wissen inzwischen, dass während bestimmter Schlafstadien sensorische Informationen von der Peripherie den Cortex und motorische Kommandos des Cortex die  $\alpha$ -Motor-Neuronen des Rückenmarks erreichen, obwohl die Efferenzen der Motorneuronen nicht arbeiten. Schlaf ist demnach nicht nur ein Leerlauf-Prozess, sondern ein aktiver neuronaler Vorgang, in dem verschiedene psychophysiologische Ereignisse aufeinander zyklisch folgen. Sie werden durch verschiedene neurochemische System gesteuert. Genaueres und über die Geschichte der Untersuchung der Physiologie des Schlafes in Kandel and Schwartz (1991). Siehe auch Borbely et al. (1999).

Schlafstruktur und Schlafstadien: Der Schlaf ist beim Menschen in verschiedene langsam-wellige Stadien (SWS) und REM Schlaf strukturiert. Eigenschaften und Bedeutung des REM Schlafes sind in Abschnitt 1.7 behandelt.

Etwa 30 bis 45 Minuten nach Ende des Wachseins beginnt das Stadium des SWS mit dem tiefsten Schlaf. Danach dauert es nochmals 30 bis 45 Minuten, um zu dem flachsten SWS zurückzukehren. Es folgt ein REM-Stadium, bevor sich wieder die verschiedenen SWS-Stadien wiederholen. Pro Nacht wechseln SWS und REM etwa 4 bis 6 mal miteinander ab. Mit fortschreitender Nacht werden die REM-Episoden länger und die Zwischenzeiten kürzer. Beim jungen Erwachsenen gehören etwa 25% des Schlafes zum REM, etwa 50% zum SWS-Stadium 2. Die Stadien 3 und 4 treten hauptsächlich in der ersten Hälfte der Nacht auf, die flacheren SWS Stadien 1 und 2 und die längeren REM-Stadien in der zweiten Hälfte der Nacht.



Abbildung 20.6: Kontrollsystem der Körpertemperatur (und vieler weiterer homöostatischer Prozesses). Ein Referenzwert-Signal (hier: mittlere Körpertemperatur) wird mit einem afferenten Signals des kontrollierten Systems (hier: Temperatur Rezeptoren der Haut, des Hypothalamus und anderer Teile des Körpers) verglichen. Bei Unterschieden wird ein Fehlersignal zu positiven (Wärmeproduktion) beziehungsweise negativen (Wärmeabgabe) Kontrollelementen gesendet, die das kontrollierte System beeinflussen. E283/t-kontrolle

Während des SWS sind die Muskeln entspannt, aber der Körper ist noch aktiv. So ändert sich zum Beispiel die Lage des Schläfers etwa alle 20 Minuten (bei einigen Personen sogar in kürzeren Perioden, für beispielsweise alle 5 Minuten). Parasympathische Aktivitäten herrschen vor. Herzschlag und Blutdruck sind verringert, die gastrointenstinale Aktivität erhöht. Mit zunehmender Schlaftiefe wird es immer schwieriger, den Schläfer aufzuwecken.

Unterschiede in der Schlaflänge werden durch die Intensität des Schlafes kompensiert (Tiefschlaf-Stadien 3 und 4 des SWS sind stärker betont, 'Schlaf-Homöostase').

Schlafmuster: Die meisten Erwachsenen vieler westlicher Länder haben ein Schlafmuster angenommen, bei dem sie die gesamte Nacht in einem Stück durchschlafen und keine Ruheperioden während des Tages ('Siesta') halten. Es gibt aber Länder, in denen die Bewohner eine Siesta am frühen Nachmittag halten. Wahrscheinlich entspricht dieses Muster den Bedürfnissen des Körpers stärker. Auf jeden Fall ist es empfehlenswert, ein bestimmtes Muster beizubehalten (Rothmann (n.d.)). Affen benutzen 5 bis 6 Ruhe- und Schlaf-Perioden pro Tag.

Auslöser des Schlafes und Schlafvorbereitungen: Schaukeln von Babys und singen von Schlafliedern induziert bei Kindern Schlaf. Eine entspannte Atmosphäre, Routinearbeit und monotone statt intensiver Aktivitäten und Aufregung am Abend helfen auch dem Erwachsenen, leichter einzuschlafen. Bestimmte Filme führen leicht zu Schlafstörungen, andere fördern den Schlaf.

Häufiges Gähnen geht oft dem Schlafbeginn voraus. Es ist für die Zirkulation wichtig. Der Körper entspannt sich, die Leistungsfähigkeit nimmt ab. Die Latenzzeit für bedingte Reflexe nimmt zu. Die Augenlider schließen sich, die Beintemperatur steigt an, die Kerntemperatur verringert sich und der Muskeltonus sinkt. Die Aktionspotentiale der Muskeln nehmen ab, Herzschlag und Blutdruck fallen.

1-5 Minuten nach Schlafbeginn treten Zuckungen auf für etwa 5 Minuten. Sie werden durch den Cortex erzeugt. Der alpha-Rhythmus verschwindet und der Muskeltonus nimmt weiter ab.

Die Einschlafzeit hängt vom Alter ab. Studenten brauchen im Schnitt 13 Minuten (8-23 Minuten Spanne), Kindergarten-Kinder brauchen 36 Minuten (24-64), Erwachsene im mittleren Alter 15 Minuten (9-25), Frauen 13 Minuten (10-17) (A22 (n.d.)). Umweltbedingungen haben ebenfalls einen Einfluss: Bei niedrigem Luftdruck schläft man schneller ein.

Körperlage während des Schlafes: Die Körperlage ändert sich während des Schlafes alle 3 bis 5 Minuten: Auf diese Weise wird vermieden, dass die Glieder taub werden. Die Augenlider schließen sich, der Augapfel dreht sich nach oben und außen. Die Muskeln sind erschlafft. Die Schlafposition variiert stark.

Schlaflänge: Beim Erwachsenen beträgt die Länge des Schlafes im Durchschnitt etwa 30% des Tages. Es gibt keine Korrelation zwischen Schlaflänge und Schulerfolg bei Kindern. Kinder mit einem hohen IQ schlafen aber kürzer. Begabte Kinder schlafen dagegen länger. Japanische Kinder schlafen kürzer als europäische. Frauen schlafen im Schnitt etwas länger als Männer (7.5 Stunden, 6 oder 9 Stunden sind Extremwerte, bei 25 Frauen beobachtet, A21 (1983)). Schlaf verkürzt sich mit dem Alter. Die Jahreszeiten beeinflussen die Schlafdauer. Aufwecken mit Wecker-Uhr verkürzt den Schlaf von 7.8 auf 7.2 Stunden). Nach Zuley (1979) ist die Schlafdauer bis zu einem bestimmten Grad voraussagbar:

- durch die Temperatur bei Schlafbeginn: Je höher, umso länger.
- durch die Lage des Körpertemperatur-Minimums: Je früher nach Schlafbeginn, umso kürzer.
- durch den Temperaturanstieg nach dem Minimum: Je langsamer, umso länger der Schlaf.

Träumen: Jeder träumt jede Nacht häufig in regelmäßigen Zyklen. Träume werden aber schnell vergessen: Ein REM-Schlaf-Traum wird nach 8 Minuten nicht mehr erinnert. Das ist der Grund dafür, dass wir uns vor allem an Träume am Morgen erinnern. Die physiologische Intensität der REM-Phasen steigt im Laufe der Nacht. Parallel dazu sind die Träume emotionaler und oft mit visuellen Inhalten ausgefüllt. Augenbewegungen zeigen REM-Schlaf an. Neuronale spike-Mechanismen (PGO-spikes) laufen parallel zu Träumen, und zwar besonders, wenn sie Ereignis-reich sind. PGO spikes sind wahrscheinlich die gemeinsame Ursache für REM und für Träume. Penis-Erektionen treten zu Beginn des REM-Schlafes auf und sind wahrscheinlich ebenfalls durch PGO's verursacht.

Viele Träume sind unangenehm (64%), nur 18% sind angenehm oder aufregend. Blinde träumen akustisch. Die Zeit während eines Traumes wird nicht verkürzt, wie oft behauptet wird.

Träume sind nicht auf den REM-Schlaf begrenzt. Sie treten auch während des SWS auf. Sie werden aber weniger gut erinnert, sind weniger Emotions-geladen und haben weniger visuellen Inhalt. Stattdessen sind sie konzeptueller und plausibler. In der Regel sind sie angenehmer. Ausnahmen sind Albträume, die gelegentlich während des SWS 3 und 4 auftreten. Sie sind mit Dyspnea, Paralyse und Angst verbunden.

Schlafhypothesen: Zur physiologischen Grundlage des Schlafes wurden eine Reihe von Hypothesen vorgeschlagen. Einige davon wurden auch experimentell getestet.

- So wurden Schlaf-induzierende Substanzen gefunden. Pieron (1913) entnahm einem Hund, der mehrere Tage am Schlaf gehindert wurde, Cerebrospinalflüssigkeit. Sie wurde einem anderen Hund injiziert, der daraufhin für 6 Stunden schlief. Später wurden eine ganze Reihe von Substanzen gefunden, die ebenfalls Schlaf induzierten: Muramylpeptid, Lipopolysaccharide, Prostaglandin, Interleucin-1, Interferon alpha-2, delta-Schlaf-induzierendes Peptid, vasoaktives intestinales Peptid und Serotonin. Alle diese Substanzen induzierten nicht nur Schlaf, sondern beeinflussten auch die Körpertemperatur und interagierten mit dem Immunsystem.
- Hess (n.d.) konnte Schlaf bei Katzen hervorrufen, indem er bestimmte Gebiete des parasympathischen und sympathischen Gehirns elektrisch erregte (4-6Hz, 2.5-3.5V). Die Wirkung hing von der Art und Stärke der Reizung ab. Thalamus und Hypothalamus waren beteiligt, aber auch andere Zentren und sogar periphere Nerven. Wichtig war nur die Art der Reizung. Bestimmte Schlaf- (und Wach-) Zentren scheinen beteiligt zu sein: Läsionen im Hypothalamus induzierten Schlaf. Ein anderes Schlafzentrum in der Pons induzierte REM-Schlaf. Außerdem wurde ein mesencephalisches Wach-Zentrum lokalisiert.

Die Schlaf- und Wach-Zentren sind offenbar antagonistisch.

Es gibt ein nicht-spezifisches aufsteigendes retikuläres aktivierendes System (ARAS) und ein diffuses thalamisches Projektions-System (DTPS). Wenn das ARAS aktiv ist, wird Wachheit induziert und Schlaf beendet. DTPS induziert den alpha-Rhythmus und hält einen bestimmten Erregungszustand aufrecht. Grundlage des ultradianen Aktivitäts-Ruhe-Zyklus (BRAC) scheint der Wechsel zwischen LV-FA Schlafphasen und HVSA zu sein. Schließlich ist noch der *Carotis sinus* für die Induktion von Schlaf von Bedeutung.

- Hormonelle Schlaf-Hypothese (Oswald (1978)). Toxine sollen für die Induktion des Schlafes verantwortlich sein. Allerdings nimmt bei Schlafentzug die Müdigkeit nicht linear zu, sondern in circadianen Wellen. Jedenfalls ändern sich Hormon-Konzentrationen mit dem Schlaf-Wach-Zyklus. Siehe (A27 (n.d.)) für Beispiele.
- Nach Jouvet (1974) sind die Neurotransmitter und Gegenspieler Serotonin und Catecholamine für die Induktion von Schlaf und Wachheit verantwortlich.
- Kleitman schlug eine Entwicklungsbedingte Hypothese für den Schlaf vor:  $\mathbf{Es}$ soll ein primitives sub-corticales Schlaf-Wach-System geben. Es kennt keine Träume und wird bei neugeborenen Kindern und gelegentlich bei Kindern ohne Cortex gefunden (der cerebrale Cortex ist auch bei Hunden nicht nötig, damit bei ihnen Schlaf ablaufen kann, Goltz (n.d.)). Dieses System besteht aus Grund-Ruhe-Aktivitäts-Zyklus einem (BRAC) mit Schlaf alle 2-4 Stunden ohne Verbindung zum Tag-Nacht- Zyklus (Kleitman (1982), Endo et al (1981)).

#### 20.8 Melatonin

• Nach Strumwasser (n.d.) benutzt der Schlaf-Mechanismus eine funktionelle Gruppe von Neuronen im Zentralnervensystem, die rhythmische Unterschiede in spontaner Aktivität zeigt. Das Auge von Aplysia kann als Modell dienen. Durch verschiedene Kontrollmechanismen in einem diffusen System (Formatio reticularis) sind das thalamocorticale und das limbische System verbunden. Die gleichen Schrittmacher-Neuronen führen entweder zum Wach- oder zum Schlaf-Stadium. Rhythmische Abgabe von Transmitter-artigen Substanzen des Kern-Stoffwechsels beeinflussen die Membran und induzieren Permeabilitäts- und Erregungsänderungen.

#### 20.8 Melatonin

In den 60er Jahren wurde gefunden, dass Melatonin als Signal für den Jahresrhythmus der Fortpflanzung bei photoperiodisch reagierenden Tieren dient: Das Muster der nächtlichen Melatoninproduktion ändert sich mit der Nachtlänge.

Melatonin ist ein sehr altes biologisch aktives Molekül. Es kommt bereits in der einzelligen Alge Gonyaulax (Balzer and Hardeland (1991), Pöggeler et al. (1989)) und bei Pterygophora (Fuhrberg and X (1996)) vor. Auch bei Insekten, Crustaceen, Mollusken und Würmern wurde es nachgewiesen (Vivien-Roels and Pévet (1986)).

In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde gefunden, dass dieses Indol sehr wirksam freie Radikale abfängt und antioxidierend wirkt. Freie Radikale sind toxisch und stellen für die Zelle einen oxidativen Stress dar. Melatonin reduziert dabei diesen Stress auf verschiedene Weisen Reiter (1997). Durch Licht gebildete Superoxidanionen werden durch Melatonin mit Hämin als Katalysator zu Kynuramin (AFMK) abgebaut (Abbildung 20.7, Balzer and Hardeland (1989), Hardeland et al. (1996), Balzer and Hardeland (1996)).

not found!

Abbildung 20.7: Schema des Abbaus von Melatonin durch Licht, welches Superoxidanionen bildet. Diese wandeln Melatonin mit Hämin oder Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) inN1-Acetyl-N2-Formyl-5-Methoxykynuramin (AFMK) um, welches durch Arylamin-(AAF) Formamidase  $_{in}$ N1-Acetyl-5-Methoxykynuramin (AMK) überführt wird. Nach Hardeland (1993). E284/mel-abbau

Melatonin wird aus Tryptophan in vier Schritten gebildet (Abbildung 20.8, Cassone and Natesan (1997)). Die Struktur von Melatonin ähnelt der des Auxins, der Gibberellinsäure, und des Cytokinins.

Melatonin kommt bei allen Vertebraten vor. Es wird vor allem in den Pinealozyten des Pinealorgans und in Zellen der äußeren Nuklearschicht der Retina in den Augen synthetisiert. Pinealorgan und Melatonin übertragen die photoperiodische Information der Umwelt an Effektor-Organe (Gern and X (1986)). Dieses System reguliert die jahreszeitliche Einpassung der Reproduktion, des Winterschlafes, der Fellfärbung und anderer physiologischer Prozesse (Cassone (1993), Weaver (1997)). Bei Nagern zum Beispiel unterdrückt Melatonin als zentrale Strategie die gesamte reprodukti-



Abbildung 20.8: Melatonin-Biosynthese: Tryptophan gelangt über das Blut in das Pinealorgan. In den Pinealozyten wird es durch Tryptophan-Hydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert und durch aromatische Aminosäure-Decarboxylase zu 5-Hydroxytryptamin dekarboxyliert. Mit Arylalkylamin N-Acetyltransferase wird Serotonin gebildet. Dieses wird durch Hydroxyindol-O-Methyl-Transferase (HIOMT) zu Melatonin umgewandelt. Die circadiane Uhr kontrolliert drei der vier beteiligten Enzyme auf dem transkriptionalen und posttranskriptionalen Niveau. Nach Cassone and Natesan (1997). E284A/mel-synthesis
ve Aktivität während des Winters und hilft auf diese Weise, Energie zu sparen. Die Besonderheiten des Melatonins und des Pinealorgans bei der Fortpflanzung von Säugern sind in Kapitel 3.6 besprochen.

Melatonin spielt nicht nur bei der Regulation der Photorezeption und visuellen Funktionen (Brainard et al. (1997)), bei photoperiodischen Reaktionen und den dabei beteiligten neuroendokrinen Ereignissen eine Rolle (Illnerova and Sumova (1997)), sondern ist auch an Immunreaktionen beteiligt (Demas et al. (1997), Demas et al. (1996), Maestroni and Conti (1996)).

Es wurde untersucht, ob das Immunsystem durch Melatonin gestärkt wird (Nelson and Blom (1994)). Dazu wurden *Peromyscus maniculatus mit* einem carzinogenen DMBA injiziert. 90% der unter Langtag gehaltenen Tiere bekamen Krebs, keins der Tiere unter Kurztag erkrankte.

Bei Vertebraten wird Melatonin vom Pinealorgan circadian abgegeben. Nachts angebotenes Licht verschiebt diesen Rhythmus (Shanahan et al. (1997)). Andererseits ist Melatonin aber auch selbst ein wirksames Mittel, um circadiane Rhythmen zu verschieben (Redman et al. (1997)).

Melatonin interferiert ferner mit der Kontrolle der Körpertemperatur (Cagnacci et al. (1997)).

Melatonin hat eine homöostatische Wirkung auf die Kerntemperatur des Körpers (via POAH) und beeinflusst die circadiane Kontrolle der Körpertemperatur über das SCN. Melatoninsekretion in der Nacht senkt die Körpertemperatur. Am Tage gegebenes Melatonin (also zu einer Zeit, zu der es normalerweise nicht sekretiert wird), senkt ebenfalls die Körpertemperatur, aber nur um  $0.3^0$  bis  $0.4^{\circ}$ C. Wird die Melatoninsekretion nachts unterdrückt, steigt die Körpertemperatur um etwa den gleichen Betrag. Wie Melatonin die Körpertemperatur senkt, ist noch unbekannt. Es könnte die Wärmeabgabe fördern, aber auch die Wärmeproduktion hemmen. Wahrscheinlicher ist aber, dass es vor allem im Hypothalamus wirkt, wo sich thermoregulatorische Zentren befinden. Die akuten thermoregulatorischen Wirkungen des Melatonins und starken Lichtes sind unabhängig vom circadianen Phasen-verschiebenden Effekt. Letztlich führen die Melatonin-Wirkungen dazu, Energie einzusparen (Cagnacci et al. (1997)).

Melatonin wirkt weiterhin Schlaf-fördernd. Es soll als chronobiotisches Mittel wirken, indem es bei Blinden, Schichtarbeitern und bei Jetlag-Problemen Störungen des circadianen Rhythmus korrigiert (Sack et al. (1997), Arendt (1997)). Ob es risikolos ist, Melatonin von außen zu geben, wird diskutiert (Borbely (1997)).

Es könnte einen geringen direkten hypnotischen Effekt haben, aber auch Anomalitäten der circadianen Phasenlage korrigieren. In diesem Fall könnte es mit Melatonin-Rezeptoren im suprachiasmatischen Kern interagieren (SCN). Als Ergebnis könnte der circadiane Schrittmacher neu gestellt werden und/oder vom SCN-abhängige circadiane aktivierende Prozesse unterbunden werden. Für Einzelheiten siehe Dijk and X (1997), Cajochen and X (1997), Zhdanova and X (1997), Mendelson (1997).

Schließlich spielt Melatonin auch bei der Entwicklung eine Rolle. Für den Fötus ist es ein Fenster zur äußeren Welt, das ihn über die Jahreszeit und Tageszeit informiert (Davis (1997)). Über Melatonin kann die Mutter das circadiane System des Fötus beeinflussen. Bei Hamstern können photoperiodische Informationen auf den Fötus übertragen werden und festlegen, ob sie sich weiter entwickeln und fortpflanzen oder ob sie vorher Winterschlaf halten werden. Melatonin ist auch bei der Pubertät beteiligt. Auch beim Menschen werden jahresperiodische Rhythmen durch Melatonin übermittelt (Wehr (1997)).

## 20.9 Synchrone Menstruation bei Kolleg-Studentinnen

Die Menstruation ist eine 3-5 Tage dauernde Blutung aus der Gebärmutter. Dabei wird die Gebärmutterschleimhaut (Endometrium) abgestoßen. Der ovarielle und uterine Zyklus beträgt im Mittel 29.5 Tage. Da der Mondumlauf siderisch 27 Tage und synodisch 29.5 Tage (da auch die Erde sich bewegt) beträgt, liegt es nahe, eine Beziehung zwischen Menstruationszyklus und Mondzyklus zu suchen. Bei äquatorialen Affen Südamerikas wurden tatsächlich solche Beziehungen gefunden. Die Menstruation erfolgt zur Zeit des Neumondes, 14 Tage später erfolgt bei Vollmond die Ovulation und Konzeption. Ob es sich dabei um einen Selektionsvorteil oder soziale Effekte handelt, ist unbekannt. Beim Menschen wurde jedoch keine feste Phasenbeziehung zwischen Mondzyklus und Menstruationszyklus gefunden (Pochobradsky (1974))<sup>8</sup>.

Es gibt aber einige Hinweise, dass der Menstruationszyklus zwischen Frauen synchronisiert ablaufen kann<sup>9</sup> Wilson (1992), Pfaff (1980), Jarett (1984), Trevathan et al. (1993)).

Eine Studie am Leibniz-Kolleg in Tübingen Schweizer (1994) geht auf die Frage ein, ob die Menstruation bei Frauen synchron verlaufen kann. Die Studentinnen leben zu zweit in einem Doppelzimmer und verbringen viel Zeit gemeinsam. 19 Teilnehmerinnen der Befragung hatten einen regelmäßigen Zyklus, bei 12 Teilnehmerinnen schwankten die Zyklen stärker. In drei von 13 Fällen verläuft die Menstruation zwischen den Studentinnen in einem Zimmer synchron. Es gibt auch eine Tendenz zur Synchronisation der Menstruation zwischen mehreren Studentinnen ('Phänomen der (mit Hygiene-Binden) gefüllten Mülleimer'). Es wäre interessant, die Untersuchung mit einer größeren Zahl von Frauen für eine längere Zeit durchzuführen. Man könnte beispielsweise nummerierte Hygiene-Binden austeilen und dann täglich die weggeworfenen notieren und für die Auswertung verwenden.

### 20.10 Schizophrenie als Nocturnalismus

Es wurde in einer ethologischen Hypothese vorgeschlagen, die Geisteskrankheit Schizophrenie als Nocturnalismus aufzufassen (Feierman (1982)). Es handelt sich dabei angeblich um einen Zustand, in dem das Gehirn sich im Wachzustand und im Licht so verhält, als ob es schläft. Nach dieser Hypothese müsste eine Besserung eintreten, wenn das Licht unter einem Schwellenwert gehalten wird.

Schizophrenie ist die verbreitetste Geisteskrankheit (Kraepelin (1896), Bleuler (1911)). 1% der Bevölkerung zeigt sie phänotypisch. Bisher gibt es keine Möglichkeit, sie zu behandeln. Schizophrene sind asozial, solitär. Sie

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup>obwohl es einige Hinweise gibt, dass in bestimmten Kulturen und bei Naturvölkern solche Zusammenhänge bestehen. Eine Yurok-Indianerin aus Californien berichtet, dass in früheren Zeiten alle nicht-schwangeren, fruchtbaren Frauen eines Haushalts gemeinsam zu einer vom Mond diktierten Zeit menstruierten (Schlehe (1978)). Es gibt weitere Hinweise (Dewan (1977), Dewan et al. (1978)).

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup>? befragte (1) 33 Studentinnen-Paare, die im gleichen Zimmer wohnten, (2) 33 enge Freundinnen-Paare in getrennten Zimmern, (3) 33 enge Freundinnen in gleichen Zimmern und (4) 33 zufällige Paare von Studentinnen. Die Gruppe (2) (33 enge Freundinnen-Paare in getrennten Zimmern) zeigte synchrone Menstruation. Auch Graham and McGrew (1980) fanden synchrone Menstruation bei 18 Paaren mit sehr enger Freundschaft. Quadagno et al. (1981) und Russel and et al. (1980) übertrugen Pheromone der Achsel auf die Oberlippe und erreichten dadurch, dass sich der Menstruations-Abstand auf 9.3 d und nach 4 Mo auf 3.4 d verkürzte. Die Versuche wurden von Preti et al. (1986) wiederholt, wobei sie eine Alkohol-Kontrolle mitführten. Die Geruchsempfindlichkeit schwankt mit dem Menstruationszyklus. Weller and Weller (1992) fand bei Lesbischen Frauen, die ständig zusammen lebten, eine hohe Synchronisation der Menstruation. Synchronisation der Menstruation ist auch zwischen Mutter und Tochter im gleichen Haus beobachtet worden (Weller and Weller (1993)). Nach (Weller and Weller (1993)) lässt sich der Menstruationszyklus durch Licht regulie-

ren. Ist damit die Ovulationszeit einstellbar?

haben falsche (unlogische) Ideen ('Delussionen'), interpretieren sensorische Wahrnehmnung falsch ('Haluzinationen'), obwohl sie klar empfinden (Kurzzeitgedächtnis nicht gestört). Im nicht verbalen Verhalten zeigen sie unangemessene Affekte, das motorische Verhalten ist komisch, manchmal bizarr. Schizophrene denken ungeordnet, sind nicht-zielgerichtet, die normalen Assoziationen zwischen Ideen sind gestört ('tangentiales Denken').

Schizophrenie wird durch eine genetische und eine nicht-genetische Komponente bestimmt. Bisher gibt es keine klaren biochemischen und/oder morphologischen Korrelate, mit denen Schizophrene und Normale unterschieden werden können.

Feierman schlägt vor, dass es sich bei der Schizophrenie nicht um einen angeborenen Stoffwechselfehler handelt. Vielmehr ist es eine phylogenetische Anpassung: Das Gehirn verarbeitet normalerweise neue Informationen aus der Umwelt im Wachzustand und speichert sie im Kurzzeitgedächtnis des limbischen Systems. Im Schlaf werden diese gespeicherten Informationen symbolisiert und kategorisiert. Dann werden sie während des P-Zustandes ('Programmiermodus') im Langzeitgedächtnis gespeichert (mit Hilfe cerebrospinaler Proteine?). Schizophrene nehmen die Informationen der Umwelt mit einem Gehirn im P-Zustand wahr, wenn sie im Licht wach sind. Genetisch gesehen sind sie jedoch nocturnal: Im Dunkeln würden sie im aktiven Zustand im Nicht-P-Zustand sein, den Normale im Wachzustand im Licht (und im Dunkeln) haben (siehe Tabelle 20.2).

Phylogenetisch ist das vielleicht so zu verstehen, dass es für soziale Gruppentiere wie den Menschen günstiger ist, wenn ein Teil der Gruppenmitglieder Nacht-aktiv ist (Schutz der Gruppe, Nachtjäger). Dafür gibt es einige Hinweise: Viele Schizophrene sind im Winter geboren (photoperiodischer Einfluss?). Unter Blinden gibt es keine Schizophrenen. Auch unter Tabelle 20.2: Gehirn-Zustand Normaler (genetisch diurnal) und Schizophrener (genetisch nocturnal) im Schlaf- und Wachzustand im Licht und im Dunkeln. Nach Feierman (1982)

	diurnal		nocturnal	
	Licht	Dunkel	Licht	Dunkel
Schlaf	Р	Р	Р	wP
Wach	NP	NP	P	NP

Narkoleptikern mit polyphasischem Schlaf gibt es keine Schizophrenie. Viele Schizophrene sind im Schlaf aktiver als im Wachen. Die Muskelspannung wird bei ihnen im REM nicht unterdrückt. Im Licht oder im schwachen Dauer-Rotlicht sollten die Symptome der Schizophrenie verschwinden. Vielleicht haben Schizophrene in anatomischer Hinsicht ein besonderes visuelles System?

## 20.11 Lithium- Versuche in Spitzbergen

Endogene Depressionen sind relativ häufig bei Menschen zu beobachten (und inzwischen gibt es auch Tiermodelle). Diese Geisteskrankheit besteht oft aus einer manischen und einer depressiven Phase (bipolare Depression). Die manische Phase kann fehlen (unipolare Depression). Während einer depressive Episode fühlt sich der Kranke traurig, hoffnungslos, pessimistisch, und schuldbeladen. Energie und Aktivität sind vermindert, Konzentration und Gedächtnis beeinflusst. Der Schlaf ist gestört (flacher, häufigeres Aufwachen, Wirkung des Schlafes verringert, verkürzt durch früheres Aufwachen, REM Latenz verkürzt). Libido ist abgeschwächt. Andere Aktivitäten, die normale Personen gern tun, werden von den Patient nicht als angenehm empfunden. Sie sind oft mit sich selbst beschäftigt und vermeiden soziale Kontakte. Mentale Ängstlichkeit, Hoffnungslosigkeit und Selbstbezichtigung führen manchmal zu Selbstmord.

Die Ursachen dieser Krankheit sind noch nicht aufgeklärt. Es gibt einige Hinweise (wie in mehreren Artikeln in Wehr and Goodwin (1983) und Halaris (1987) beschrieben), dass das circadiane System Depressiver verändert ist und vielleicht sogar kausal an dieser Geisteskrankheit beteiligt ist. Nach einer Hypothese soll bei Depressiven die Phase eines bestimmten circadianen Rhythmus verfrüht sein. Das könnte die verkürzte REM-Schlaf-Latenz erklären, den verfrühten Rhythmus der Körpertemperatur, der Sekretion von Elektrolyten, von Neurotransmittern und Hormonen. Einige Hypothesen versuchten, die Krankheit mit spezifischen Anomalitäten im circadianen System zu verbinden. So wurde vermutet, dass eine circadiane Komponente frei läuft, dass es zwischen zwei oder mehr circadianen Oszillatoren zur internen Desynchronisation kommt, dass sich die Kopplung von Oszillatoren ändert. Es wurde auch eine Hypothese vorgeschlagen, bei der photoperiodische Reaktionen beteiligt sind.

Zu den verschiedenen Therapien gegen endogene Depressionen gehört auch eine Behandlung mit Li<sup>+</sup>- Salzen, die vor allem die manische Phase verbessert. Im Hinblick auf die erwähnten Störungen des circadianen Systems bei Depressiven war es interessant, dass Li<sup>+</sup>-Salze bei einer Reihe von Pflanzen und Tieren die Periodenlänge erhöht (Engelmann (1987)). Wenn im depressiven Zustand ein Oszillator des circadianen Systems zu schnell ist, um durch die 24 Stunden-Zeitgeber der Umwelt synchronisiert zu werden, könnte er frei laufen oder eine verfrühte Phasenlage zu den anderen Oszillatoren haben. Die therapeutische Wirkung des Li<sup>+</sup>-Salzes könnte darauf beruhen, das er diesen zu schnellen Oszillator verlangsamt und damit das gestörte circadiane System wieder normalisiert.

Um zu prüfen, ob Li<sup>+</sup>-Salze auch beim Menschen den circadianen Rhythmus verlangsamen, wie es bei anderen Organismen beobachtet wurde, haben wir 1979 ein Experiment in Spitzbergen durchgeführt (Johnsson et al. (1980)). Diese Insel wurde gewählt, weil sie weit im Norden liegt  $(79^{0}N)$  und deshalb im Sommer die Sonne nicht untergeht. Man kann also unter konstanten Bedingungen circadiane Rhythmen des Menschen untersuchen, wenn dafür gesorgt wird, dass die Teilnehmer keine Zeitgeber des 24-Stunden-Tages haben (Uhren, Radio, Fernsehen). Vier Studenten aus Trondheim in Norwegen und 6 aus Tübingen nahmen an diesem Experiment 1982 teil. Sie lebten zu zweit für vier Wochen in Hütten in der Nähe von Ny Alesund. Ihre Körpertemperatur und Handbewegung (als Maß der lokomotorischen Aktivität) wurde automatisch gemessen und die Schlafenszeit registriert. Entweder in der ersten oder in der zweiten Zeit des Versuchs wurde Lithiumkarbonat in Tabletten gegeben, in der Kontrollzeit Placebo-Tabletten.

Während der Zeit, zu der Lithiumkarbonat-Tabletten genommen wurden, war die Periode verlängert (Abbildung 20.9). Wir schlossen aus diesen Ergebnissen, dass Li<sup>+</sup> die Periode des circadianen Rhythmus des Menschen verlängert, wie es für andere Organismen (und in der Zwischenzeit auch für Affen, A23 (n.d.)) gefunden worden war. Depressive haben möglicherweise (unter normalen Bedingungen) einen circadianen Rhythmus (einen von mehreren des circadianen Systems?), der zu schnell ist und deshalb sich nicht an den 24 Stunden-Rhythmus der Umwelt anpassen kann. Durch Li<sup>+</sup> wird dieser Rhythmus verlängert und kann sich jetzt an den 24 Stunden-Tag anpassen. Alternativ könnte Li<sup>+</sup> die Kopplungsstärke zwischen circadianen Oszillatoren ändern und der schnelle Oszillator kann wieder an den langsameren koppeln und damit am Freilauf gehindert werden (Engelmann et al. (1983)).



Abbildung 20.9: Lithium-Salze verlängern den circadianen Rhythmus beim Menschen: Periodogramme von drei verschiedenen circadianen Rhythmen bei einem Versuchsteilnehmer für Aktivität (rot), Körpertemperatur (grün) und Schlaf-Wach-Rhythmus (blau) mit Placebo (oben) und mit Li<sup>+</sup>-Tabletten. Alle drei Maxima bei 26 Stunden in der oberen Kurven unterscheiden sich von denen der unteren Kurve mit 27 Stunden signifikant (95% Konfidenz). Nach Johnsson et al. (1983). D284C/spitsbergen-li



Abbildung 20.10: Links: Biolumineszenz von Bakterien, die in Taschen des Thorax eines Käfers leben. Rechts: Biolumineszenz bei einer Qualle (rechts). Aus A35 (n.d.b). E285/biolum-bakt

## 20.12 Beispiele für Biolumineszenz

Gonyaulax polyedra zeigt einen circadianen Rhythmus der Biolumineszenz (siehe Kapitel 4). Biolumineszenz wird auch bei vielen anderen Organismen gefunden. In allen Fällen wird ein Luciferin Lf durch das Enzym Luciferase Lfase und Sauerstoff in oxidiertes Luciferin Ox-Lf umgewandelt. Bei diesem Vorgang entsteht Licht. Das Luciferin ist oft hitzestabil, die Luciferase nicht. Abbildung 20.10 zeigt zwei Beispiele. Hier sind einige weitere Beispiele für Biolumineszenz:

**Bakterien** Achromobacter fischeri (=Photobacterium phosphoreum) benutzt ein geradkettiges Aldehyd R\*CHO, das durch eine Luciferase in R\*COOH und Licht umgewandelt wird. Dabei handelt es sich nicht um ein klassisches Luciferin, sondern um zwei Cofaktoren. Zum Messen des Lichtes werden Photomultiplier mit Peltierelement und Thermoelement benutzt.

**Pilze** Biolumineszenz gibt es bei einer Reihe von Pilzen. Bei einigen ist das Leuchten circadian: *Panus stipticus*, *Armillaria mellea* (Hallimasch), *Myceana polygramma* (vielstichiger Helmling). Der chemische Vorgang ist:

 $(DPNH System + Lf \Rightarrow DPNH Oxase \Rightarrow LfH_2 + System:$  $DPNLfH_2 \Rightarrow LFase, O_2 \Rightarrow Lf + H_2O + L$  $Lf \Rightarrow Lf$ 

**Insekten** Auch bei Insekten kommt Biolumineszenz vor, so bei *Photinus pyrralis* (Lampyridae, etwa 2000 Spezies), Lampyris noctiluca, Phaussis splendidula, Luciola noctiluca, Photuris, Platyura, Pyrophorus, bei der Elateride Phrixothrix und bei Orfelia fultoni. Die Larven von Pilzmücken Arachnocampa luminosa von Neuseeland, denen bei uns Ceroplatus

entspricht, haben eine Lichtausbeute von 88% (562 nm). Sie benutzen das ATP-System

 $LfH_2 + ATP + E \Rightarrow Mg \Rightarrow ELfH_2AMP + pH ELfH_2AMP \Rightarrow Lfase, O_2 \Rightarrow Lf + H_2O + AMP + L$ 

Das Luciferin dieses Tieres wurde als erstes Luciferin aufgeklärt. Es unterscheidet sich völlig von anderen Luciferinen und ist das einzige natürliche Benzothiazol-Derivat. Die Synthese dieser Substanz ist gelungen.

**Krebse** Der japanischer Muschelkrebs *Cypridina hilgendorfii* (Unterklasse *Ostracoda*) ist ein Sandbewohner, der nachts an die Wasseroberfläche kommt. Er hat zwei Drüsen in der Oberlippe, die Biolumineszenz zeigen. Das getrocknetes Pulver wird in Japan verwendet. Reaktion:  $LfH_2 + O_2 \Rightarrow Lfase \Rightarrow Lf + L$ 

**Hemichordata** *Ptyclodera* (Enteropneust, Eichelwurm) mit Photozyten (diurnaler Rhythmus?).

Balanoglossum:  $2LfH_2 + H_2O_2 \Rightarrow Lfase \Rightarrow$  $Lf + H_2O + L(Peroxidase - System)$ 

**Dinoflagellaten** Neben *Gonyaulax* zeigen auch andere Dinoflagellaten Biolumineszenz, wie *Noctiluca*, *Pyrodinium bahamense*, *Gymnodinium breves*. Sie verwenden ein geladenes System:

$$Lf \Rightarrow Lfase \Rightarrow OxiLf + L$$

**Coelenteraten** Biolumineszenz bei Coelenteraten kommt bei *Renilla* vor.

 $Lf+Lfase \rightarrow D_1 \Rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow O_2 \Rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow OxiLfase \rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow OxiLf+Lfase \rightarrow OxiLf+Lfase$ 

Bei der Qualle Aequorea gibt es kein Luciferin und sie braucht kein  $O_2$ , aber  $Ca^{2+}$ ist für die Anregung des Photoproteins nötig. Aequorin wird zum  $Ca^{2+}$  Nachweis benutzt. Bedeutung der Biolumineszenz Innerhalb einer Art kann die Biolumineszenz zum Erkennen und Finden der Geschlechter dienen wie beim Glühwürmchen, oder zur Balz wie beim Polychaet *Odontosyllis*, dem Palolo des Atlantik, oder zur Schwarmbildung oder Territorium-Markierung.

Interspezifisch dient Biolumineszenz zur Beleuchtung des Gesichtsfeldes z.B. in trübem Wasser. Mit Hilfe der Biolumineszenz kann auch Beute angelockt werden wie durch die Leuchtorgane des Fisches *Anomalops*, die in Japan als Köder zum Fischen verwendet werden. Biolumineszenz kann auch als Schutz dienen, indem sie Feinde abschreckt, zur Tarnung, indem sie Feinde vom Vorderende ablenkt, wie bei manchen Würmern.

Chemisch dient die Biolumineszenz zum Teil zum "Verbraten" von  $H^+$ : Sie stellt einen Kurzschluss für Elektronen der Pyridinnukleotide dar. Es ist eine effektive Methode, um  $NAD^+$  unter  $O_2$ -Mangel zu reduzieren. Ursprünglich war wohl die Biolumineszenz eine Begleiterscheinung chemischer Reaktionen, um  $O_2$  aus dem System zu entfernen. Später entwickelten sich Organismen, die  $O_2$  direkt in der Stoffwechselmaschinerie verwenden konnten. Biolumineszenz war dann kein Vorteil mehr, wurde aber unter bestimmten Bedingungen beibehalten, zum Beispiel um Kompetition mit anderen Bakterien zu ermöglichen.  $O_2$ Mangel induziert Lumineszenz. Das kann von einigen Fischen benutzt werden, um die Biolumineszenz von Bakterien zu kontrollieren, die sie bewirten.

#### 20.13 Das Phytochromsystem

Licht spielt bei der Entwicklung der Pflanzen eine herausragende Rolle. Von der Samenkeimung über das Wachstum der Keimlinge bis zur Blütenbildung bestimmt es wichtige Vorgänge und Entwicklungsschritte. Wird zum Beispiel Samen eines Lichtkeimers belichtet, keimen fast alle Samen. Im Dunkeln dagegen gibt es keine Keimung (Abbildung 20.11). Hellrotes Licht fördert diesen Vorgang, während Dunkelheit oder dunkelrotes Licht die Keimung hemmt. Werden die Samen erst mit hellrotem Licht und kurz danach mit dunkelrotem Licht bestrahlt, keimen sie nicht. Entscheidend ist die Farbe des zuletzt gegebenen Lichtes. Zahl-



Abbildung 20.11: Die Samenkeimung von Salat wird durch hellrotes Licht induziert und durch dunkelrotes Licht gehemmt. Wenn rotes Licht (1 Minute) und dunkelrotes Licht (4 Minuten) auf einander folgen, entscheidet das zuletzt gegebene Licht darüber, ob die Samen keimen oder nicht. Von links nach rechts: R; R,FR; R,FR,R; R,FR,R,FR,R,FR,R,FR. Bei mehrfacher Belichtung mit Hellrot und Dunkelrot entscheidet das zuletzt gegebene Licht darüber, ob die Samen keimen (aus Salisbury and Ross (1991), nach Borthwick). E286A/Samenkeimung

reiche Vorgänge werden durch ein Wechselspiel zwischen hellrotem und dunkelrotem Licht gesteuert. Ihnen liegt das Phytochromsystem zugrunde (Tabelle 20.3). Auch bei rhythmisch gesteuerten Prozessen und bei photoperiodischer Zeitmessung ist das Phytochrom oft beteiligt. Deshalb werden wir uns etwas näher damit beschäftigen.

Das Phytochrom ist ein blaues Pigment. Hellrotes Licht (stärkste Wirkung: 666nm) wandelt es bis zu 85 % in eine olivgrüne Form um (mit maximaler Absorption bei 730 nm). Diese ist die physiologisch aktive Form. Durch

Casal et al. (1997) und Jouvet (1994)						
Vorgang	Signal	Information	Wirkung			
Samenkeimung	Sonnenlicht	Oberfläche des Bodens	VLFR			
De-Etiolierung	erster Übergang c	Herauswachsen aus der Erde	VLFR,HIR			
Nachbarn entdecken	Dunkel/Licht	PhyB nimmt $\downarrow \frac{R}{FR}$ wahr	?			
Schatten vermeiden	viel/wenig Licht (Schatten	Nachbarn, beschattende Objekte	HIR			
Uhr neu setzten	Licht-an, Licht-aus	Dauer des natürlichen Tages	VLFR,HIR			
flowering	Tageslänge	Jahreszeit	HIR			

Tabelle 20.3: Kontrolle verschiedener Prozesse von Pflanzen durch das Phytochromsystem. Nach



Abbildung 20.12: Chemische Struktur des Phytochrom-Chromophors, einem Tetrapyrrol, in seiner rot-  $(P_r, \text{ cis})$  und dunkelrot- empfindlichen Form  $(P_{fr}, \text{ trans})$ . E286BC/phytochrome-chem

dunkelrotes Licht wird es wieder in die hellrot absorbierende Form umgewandelt (Abbildung 20.13). Die Revertierbarkeit ist charakteristisch für Phytochrom. Sowohl Absorptionsals auch Aktionsspektren sind in Abbildung 20.13 dargestellt. Maximale Absorption und Wirkung haben also der hellrote  $(P_r)$  und der dunkelrote  $(P_{fr})$  Spektralbereich. Im blauen Bereich ist die Absorption geringer. Grünes Licht wirkt nicht und kann deshalb als Sicherheitslicht verwendet werden. Bei Belichtung stellt sich ein Gleichgewicht ein. Es wird durch  $\frac{P_{fr}}{P_{total}}$ beschrieben. Bei hellroter Bestrah- $\Phi =$ lung ist  $\Phi = 0.85$ . Es wird also nicht alles  $P_r$ in  $P_{fr}$  umgewandelt, weil sich die Absorptions-Kurven der beiden Pigmentformen teilweise überschneiden. Dadurch wird auch durch hellrotes Licht ein Teil des  $P_{fr}$  wieder in  $P_r$  zurückverwandelt. Der Farbstoff ist ein Tetrapyrrol (Abbildung 20.13). Es ähnelt dem Phycobilin der Rotalgen und Cyanobakterien. Über ein Schwefel-Atom ist es an den Cystein-Rest eines Polypeptids gebunden. Es handelt sich um ein Homodimer aus zwei 120 kDa Polypeptiden mit jeweils 1100 Aminosäuren. Jedes Polypeptid besteht aus zwei Untereinheiten von 74 und 55 kDa, die am C-terminalen Ende dimerisieren (Abbildung20.14). Durch Absorption hellrotem Lichtes isomerisiert die Chromophore (das Tetrapyrrol) aus der cis- in die trans-Form über. Dadurch ändert sich die Struktur der Polypeptide in einer Art, die noch unbekannt ist (polypeptide multiple Konfigurationsunterschiede, Vierstra (1993)). Aus dem physiologisch inaktiven  $P_r$  hat sich so das physiologisch aktive  $P_{fr}$  gebildet. Wie die verschiedenen physiologischen Wirkungen zustande kommen, ist noch ungeklärt.

Es gibt eine ganze Familie von Phytochromen, die durch verschiedene Gene kodiert werden. Bei Arabidopsis thaliana sind bisher fünf solcher Phytochrome und Gene bekannt (Phytochrom A bis E). Sie und/oder ihr unterschiedli-



0.8

0.2

0

Wirkung

uoitdrosdA

Abbildung 20.13: Oben: Absorptionsspektren für das rot-  $(P_r)$  und dunkelrot-empfindliche Pigmentsystem  $(P_{fr})$  von Avena (Vierstra and Quail (1983)). Unten: Aktionsspektrum der Phytochrom-kontrollierten Förderung der Samenkeimung von Salat (rot, P<sub>r</sub>) oder seiner Hemmung (blau, P<sub>fr</sub>). Nach Borthwick et al. (1954). D286Bn/phytochrome

Förderung

400

300

phyt-kal | D286BN | 18.4.2002

500

600 700

Wellenlänge [nm]

800

#### Spezialthemen



Abbildung 20.14: Struktur des Holophytochroms. Das Molekül ist ein Dimer, welches aus zwei 120 kDa Polypeptiden (rot und grün) besteht, jedes mit 1200 Aminosäuren. Jedes Polypeptid besteht aus zwei Untereinheiten von 74 (rot) und 55 kDa (grün), die am C-Ende dimerisieren. Das Phytochrom-Chromophor ist ein Tetrapyrrol und an einer Domäne des N-Endes angeheftet. Nach Vierstra (1993). E286En3/phytochrome ches Zusammenwirken sind für die verschiedenen physiologischen Wirkungen verantwortlich. Im Dunkeln wächst die junge Pflanze stark in die Höhe. Sobald sie von Licht getroffen wird, wird dieses Etiolement ('Vergeilen') eingestellt. Hellrotes Licht wirkt dabei am stärksten, dunkelrotes Licht macht die Wirkung des Hellrot wieder rückgängig. Phytochrom A ist für diese De-Etiolierung des Keimlings zuständig. Aber auch Phytochrom B spielt dabei eine Rolle (siehe Abbildung 20.15). Das Phytochrom A und seine mRNA werden durch Licht schnell inaktiviert und abgebaut (zum Abbau siehe Clough (1997)). Die anderen Phytochrome (B bis E bei Arabidopsis thaliana) sind dagegen stabil.

Wie die verschiedenen Phytochrome miteinander interagieren und welche weiteren Pigmente an den Phytochrom-Reaktionen möglicherweise beteiligt sind, wird intensiv untersucht.

Phytochrom kann spektralphotometrisch oder immunologisch nachgewiesen werden. Der immunologische Nachweis ist tausendfach empfindlicher als der spektralphotometrische. Er lässt sich auch in grünem Gewebe anwenden, während in ihm durch das Chlorophyll der spektralphotometrische Nachweis des Phytochroms nicht gelingt. Auf diese Weise wurde Phytochrom auf der Ebene der Zellen nachgewiesen. Es kommt im Kern und Cytosol vor, nicht aber in der Vakuole, den Organellen und Membranen (Warmbrodt et al. (1989)).

Phytochrom wurde bei Angiospermen, Gymnospermen, Lebermoosen, Moosen, Farnen, einigen Grün-, Rot- und Braunalgen nachgewiesen.

Die Synthese des Phytochromobilins erfolgt aus Glutamat über  $\delta$ -Aminolävulonsäure, Protoporphyrin, Häm und Biliverdin im Plastid. Phytochromobilin wird aus dem Plastid ins Cytoplasma gebracht (Abbildung 20.18). Dort bildet es mit Apophytochrom das Holophytochrom (Terry (1997)). Zum Abbau des Phytochroms wird Ubiquitin benutzt. Interessan-



Abbildung 20.17: Struktur des Phytochrom-Moleküls (PhyA oder PhyB) und Bedeutung der verschiedenen Abschnitte. Die Befunde beruhen auf Untersuchungen und Mutanten und Deletionen transgener Pflanzen. Zum Beispiel gibt es Mutanten, die in ihrer Photorezeptor-Funktion normal sind, aber in den regulatorischen Funktionen defekt sind. Die meisten dieser Mutationen finden sich in einer (in der Abbildung blau markierten) Region von 160 Aminosäuren. Das lineare Tetrapyrrol-Chromophor (roter Balken) gehört zum photo-sensorischen Teil (600 Aminosäuren), welches die Spezifität des Phytochroms bestimmt. Die grün markierte Region (18 Aminosäuren) ist besonders kritisch für die Interaktion zwischen Photorezeptor und Signaltransduktion. Sie ist von der photo-sensorischen Domäne durch eine Protease-empfindliche hinge Region getrennt (schwarz). Der C-terminale Teil enthält auch die Dimerisierungs-Domäne (gelb). Am N- und C-Terminal sind Regionen, die die biologische Aktivität beeinflussen (braun). Nach Quail (1997) und Batschauer (1998). E286E/phytochromkodierung

terweise verläuft auch die Chlorophyllsynthese und die Häm-Synthese der Tiere zum Teil auf gleichen Wegen. Beim Säuger wird das Häm über Biliverdin und Bilirubin zu Bilirubin-Zucker-Estern abgebaut (Oren (1997)). Molekularbiologische und molekulargenetische Untersuchungen in den neunziger Jahren haben etwas Licht in die Kodierung des Phytochromsystems und seine Funktionen gebracht (Quail (1997)) (siehe Abbildung 20.17). Die Funktionen des Phytochroms lassen sich in die Lichtperzeption (also die Interpretation der Lichtsignale der Umwelt) und die regulatorischen Funktionen (Expression von Genen für die Phytochrom-gesteuerten Reaktionen) durch das aktivierte Phytochrommolekül auftrennen (Tobin and Kehoe (1994)). Ferner sind auch Angriffspunkte für den Abbau des Phytochrommoleküls (Proteolyseweg über Ubiquitin und Proteasomen, Clough (1997)) vorhanden. Mehr darüber in der Abbildung

20.17. Die Licht-empfindlichen Funktionen des Phytochroms werden durch den N\_terminalen Teil bestimmt, die Signalübertragung auf nachgeschaltete Komponenten durch den Cterminalen Teil des Gens. Im N-terminalen Teil ist die Stelle des Proteins kodiert, an der das Tetrapyrrol-Chromophor kovalent gebunden wird. Die Dimerisierung des Proteins wird in einer Region im Zentrum des Gens und im C-terminalen Teil determiniert.

Welche Vorgänge nach der Aktivierung des Phytochroms durch Licht sich abspielen, um über intermediäre Prozesse das Kerngenom zu beeinflussen, ist noch weitgehend ungeklärt. Trimere G-Proteine, cGMP und  $Ca^{2+}$  scheinen dabei wichtig zu sein. Die Signalwege für die entsprechenden Genexpressionen scheinen vorprogrammiert zu sein und zu den jeweiligen Entwicklungsprogrammen zu führen. Bei den Mutanten *cop*, *det* und *fus* entwickeln sich die Keimlinge im Dunkeln wie wenn sie sich im



Abbildung 20.15: Interaktion von Phytochrom B und Phytochrom A bei der De-Etiolierung von Keimlingen: Die Hellrot-absorbierende Form des Phytochrom B wird durch Dauer-Rotlicht in die Dunkelrot-absorbierende Form überführt. Sie unterbindet die Etiolierung (fördert die De-Etiolierung). Andererseits wird das Phytochrom A durch Dauer-Rotlicht abgebaut. Dauer-Dunkelrot überführt die Dunkelrotabsorbierende Form des Phytochrom B in die Hellrot-absorbierende Form. Dadurch wird die De-Etiolierung unterbunden (die Pflanzen etiolieren +). Nach Quail et al. (1995). 286C/deetiolierung



Abbildung 20.16: Phytochrom A als Lichtregulierter Schalter bei morphogenetischen Vorgängen (Etiolierung/Deetiolierung): $P_r$ stellt die Schalter-aus- Konformation dar, $P_{fr}$ die Schalter-an-Konformation. Nach Casal et al. (1998).286F/ phyt-schalter



Abbildung 20.18: Synthese des Phytochroms aus  $\delta$ -Aminolävulonsäure, Protoporphyrin, Häm und Biliverdin. Die Chlorophyllsynthese in Pflanzen und die Häm-Synthese bei Tieren verwendet bis zum Protoporphyrin die gleichen Wege. Beim Säuger wird das Häm über Biliverdin und Bilirubin zu Bilirubin-Zucker-Estern abgebaut. Einige der beteiligten Enzyme in grün. Nach Oren (1997). 286D /phytochromsynthesis

Licht befänden (sie etiolieren also nicht). Offenbar sind die Produkte dieser Gene am Lichtabhängigen Hauptschalter (Abbildung 20.16) beteiligt. Dieser Schalter liegt zwischen den Eingangssignalen des Photorezeptors und den nachgeschalteten Kaskaden von Genexpressionen und steuert die Photomorphogenese. Bei den Mutanten hy5, fhy1 und fhy3 dagegen etiolieren die Keimlinge im Dunkeln wie der Wildtyp, aber sie reagieren nicht auf Licht durch De-Etiolierung (Bowler (1994)). Hier ist durch die Mutationen offenbar die Maschinerie betroffen, die für die Lichtaufnahme zuständig ist.

Ein Zwei-Punkte-Kontakt-Modell von Quail (1997) erklärt, wie multiple sensorische Zustände (Wellenlänge, Intensität, Dauer, Periodizität) zu so unterschiedlichen regulatorischen Ergebnissen kommen können wie Samenkeimung, De-Etiolierung, Schatten vermeiden, Blühen, wie in Abbildung (20.19) dargestellt. Die pleiotrope Kontrolle des Wachstums und der Entwicklung wird durch Regeln der Genexpression erreicht.

Über die Bedeutung des Phytochroms bei photoperiodischen Reaktionen von Pflanzen wurde bereits im Abschnitt 13.2.5 gesprochen. Bei der photoperiodischen Blühinduktion hemmt das Licht-stabile Phytochrom B die Blühinduktion und andere photoperiodische Vorgänge wie die Knollenbildung. Es ist aber nicht an der Tageslängen-Messung beteiligt. Das Lichtlabile Phytochrom A dagegen scheint ein essentieller Teil des Mechanismus zu sein (Jackson and X (1997)). Bei der Langtagpflanze Arabidopsis thaliana ist weder Phytochrom A noch Phytochrom B für die Induktion der Blüten durch Dunkelrot am Ende des Tages zuständig, sondern möglicherweise ein weiteres Phytochrom (Goto et al. (1991)). Phytochrom C spielt bei der photoperiodischen Reaktion von Kurztagpflanzen eine Rolle, während Phytochrom A hier keine Bedeutung hat.



Abbildung 20.19: Ein Zwei-Punkte-Kontakt-Modell der Phytochroms-Wirkung: Die $NH_2$ - Enden des Phytochroms (B oder A) enthalten spezifische Erkennungs-Determinanten (roter Balken), die je nach Photo-sensorischer Spezifität (Wellenlänge, Intensität, Dauer, Periodizität) an separate Reaktionspartner $X_1$  (rot) oder  $X_2$  (braun) und so weiter binden (blauer Pfeil) und somit eine unterschiedliche Zielwahl zeigen. Das durch das Licht induzierte Signal interagiert (schwarzer Pfeil) mit einer Kernregion (grün) des COOH-Teils. Es kommt zu biochemischen Modifikationen durch Bindung (grüner Pfeil) mit einer generellen Determinante (dreieckige Einkerbung), die bei allen Reaktionspartner X1, X2 etc. vorhanden ist. Auf diese Weise kommt es zu so unterschiedlichen regulatorischen Ergebnissen wie Samenkeimung, De-Etiolierung, Schatten vermeiden, Blühen. Nach Quail (1997). 286G/phytochrom-modell

# 20.14 Das Auge der Säuger erkennt neben Bildern auch die Zeitstruktur der Umwelt

Das Auge der Säuger dient nicht nur dazu, die visuelle Umwelt zu erkennen, sondern auch ihre Zeitstruktur an das Gehirn zu vermitteln. Im paarigen SCN des Hypothalamus liegen die Zellen, die das Zentrum der circadianen Uhr darstellen.

Die circadianen Uhren der Wirbeltiere werden wie die anderer Organismen vor allem durch den Licht-Dunkel-Wechsel auf die 24-Stunden-Struktur der Umwelt synchronisiert. Während bei den Nicht-Säugern neben den Augen auch andere Lichtrezeptoren dafür eingesetzt werden, scheinen bei den Säugern nur die Augen das circadiane System im Tages-Takt zu halten.

Kürzlich wurde allerdings eine Arbeit veröffentlicht (Campbell and Murphy (1998)), die eine extraretinale Synchronisation des circadianen Rhythmus nahe legt. Kniekehlen von Versuchspersonen wurden zu geeigneten Zeiten mit hellem Licht von 13000 Lux bestrahlt. Dadurch konnte der Rhythmus der Körpertemperatur verschoben werden. Als Photorezeptor vermuten die Autoren Häm-Verbindungen wie Hämoglobin oder Bilirubin (siehe auch Oren (1996)). Lichtaktivierung dieser Verbindungen könnte Signal-Gase wie CO und NO freisetzen ('humorale Lichtübertragung'). Nach anderen Untersuchungen werden Phasenverschiebungen des Tagesrhythmus im SCN durch NO bewirkt.

Es wird aber stark angezweifelt, ob diese Befunde stimmen (Foster (1998)). Es gibt Einwände zur experimentellen Durchführung. Außerdem wird darauf hingewiesen, dass bei Menschen, die ihre Augen verloren haben oder die von Geburt an blind sind, circadiane Reaktionen auf Licht fehlen (Czeisler and Dijk (1995)). Auch zahlreiche Experimente mit Nagern zeigen das. So wurden von Nelson und Zucker (1981) Goldmantel-Erdhörnchen ohne Augen im Freien gehalten. Im Gegensatz zu den Kontrollen mit Augen wurden die blinden Tiere durch das starke Licht (durchschnittliche Intensität 55000 Lux) nicht synchronisiert. Ihr Tagesrhythmus zeigte vielmehr Freilauf. Auch schwächere Lichtintensitäten synchronisieren bei blinden Nagern nicht den circadianen Rhythmus (Foster et al. (1991)). Weiterhin entspricht das Aktionsspektrum phasenverschiebenden Lichtes dem Absorptionsspektrum der Opsin-Photopigmente der Vertebraten (Provencio and Foster (1995)). Das spricht dafür, dass die Photopigmente für die Synchronisation von Tagesrhythmen und die visuellen Pigmente die gleiche Grundstruktur haben (nämlich Opsin und Retinaldehyd (= Vitamin A) als Chromophor). Wenn Tetrapyrrole für die Synchronisation zuständig wären, müsste das Aktionsspektrum mehrgipflig sein. Das ist aber nicht der Fall.

Andererseits sind die Stäbchen in der Retina nicht für die Synchronisation circadianer Rhythmen nötig. Der circadiane Rhythmus homozygoter Mausmutanten rd/rd (retinal degeneration) kann noch durch Licht synchronisiert werden, obwohl bei diesen Tieren im Alter von 60 Tagen fast alle Stäbchen degeneriert sind. Im Alter von 90 bis 150 Tagen sind die elektrophysiologischen und Verhaltens-Reaktionen auf grobe visuelle Reize völlig verschwunden. Nur noch wenige Zäpfchen sind in diesem Alter vorhanden, und sie besitzen keinerlei äußere Segmente. Trotzdem sind auch dann die Tiere synchronisierbar. Der Schwellenwert des synchronisierenden Lichtes ist der gleiche wie bei intakten Kontrolltieren (Foster et al. (1991)). Vermutlich genügen die wenigen Zäpfchen ohne äußere Segmente noch zur Synchronisation. Transgene Mäuse ohne M-Zäpfchen und mit nur wenig S- Zäpfchen lassen sich ebenfalls synchronisieren. Auch grünes Licht genügt zur Synchronisation, ein Farbbereich, in dem die Stäbchen maximal empfindlich sind. Man könnte also annehmen, dass die synchronisierenden Eingänge zur Uhr redundant sind. Sowohl Zäpfchen als auch Stäbchen genügen zur Synchronisation. Alternativ könnte auch ein noch unbekannter grün-empfindlicher Photorezeptor verantwortlich sein (Roenneberg and Foster (1997)). Bisher unbekannte retinale Photopigmente wurden bei Fischen (Soni et al. (1998)) und Amphibien (Provencio and X (1998)) entdeckt.

Das Säugerauge hat also zwei distinkte sensorische Aufgaben: Bild-formende und nicht-Bildformende Lichtdetektion. Die beiden Leistungen des Auges werden dann im Zentralnervensystem getrennt. Dafür spricht folgendes:

- Es gibt eine Population retinaler Ganglionzellen, die zum SCN projizieren, aber nicht zu den visuellen Zentren des Gehirns (Provencio and X (1998)).
- Auch Blindmole (Spalax ehrenbergi) können noch ihren Tagesrhythmus synchronisieren, obwohl ihre Augenreste keine Bilder mehr wahrnehmen. Die für die Bildverarbeitung nötigen Hirnzentren fehlen oder sind extrem reduziert. Das SCN dagegen ist gut entwickelt und erhält Projektionen von der Rest-Retina (Cooper and X (1993)).

# 20.15 Circadian kontrolliertes Sehen beim Pfeilschwanzkrebs

Der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* (*Xiphosura*) gehört zu den *Chelicerata*, einem Unterstamm der Arthropoden. Sie kommen an der Atlantikküste von Nordamerika von Yukatan bis Neu-Schottland vor. Circadiane Rhythmen im visuellen System sind für sie charakteristisch und entsprechen denen der Skorpione (Fleissner and Fleissner (1985)) und orb-Spinnen (Yamashita and Tateda (1978), Yamashita and Tateda (1981)). Bei anderen Invertebraten (Krebse, Arechiga and Wiersma (1969), Page and Larimer (1975)) sind offenbar hormonelle Vorgänge beteiligt. Limulus besitzt Lateralaugen, mediane Ozellen und ventrale Photorezeptoren. Die zentralen Projektionen der verschiedenen Photorezeptoren wurden mit Hilfe monoklonaler Antikörper sichtbar gemacht (Calman et al. (1991)).

Im Gegensatz zu den Meeresschnecken Aplysia und Bulla, enthalten die Retinas der Photorezeptoren von Chelicerata (Skorpione, Pfeilschwanzkrebse, Spinnen) und Crustacea keine circadianen Schrittmacher in den den Augen. Stattdessen senden efferente Nerven vom optischen Lappen des Gehirns circadiane Signale zu den visuellen Strukturen dieser Organismen und modulieren sie. Dadurch zeigen die lateralen und medianen Augen einen deutlich ausgeprägten circadianen Rhythmus. So ist zum Beispiel die maximale Amplitude des ERG nach alle 30 Minuten gegebenen Lichtpulsen des Skorpions Androctonus australis während der Nacht fünf mal empfindlicher als während des Tages (siehe Abbildung 20.20). Es ist die Regel, dass Sinnesorgane nicht nur Signale aus der Umwelt erhalten, sie kodieren und zum Gehirn weiterleiten, sondern dass sie auch Signale vom Gehirn erhalten. Diese zentralen Rückkopplungssignale bereiten die Organe auf spezifische Reize vor, passen die sensorischen Funktionen an Änderungen in der Umwelt und/oder kontrollieren den Stoffwechsel in den Rezeptoren. Efferente neuronale Wege oder Neurohormone können diese Rückkopplungen beeinflussen. Das visuelle System von Limulus illustriert das gut.



Abbildung 20.20: ERG eines dunkel-adaptierten Medianauges des Skorpions Androctonus australis (links) während der Tagphase (blau) und während der Nachtphase (rot). Die Reaktionen werden durch Lichtpulse von 500 msec Dauer über Glasfasern angeboten. Die Reaktion wird mit einem dünnen ( $20\mu$ m) Platindraht gemessen, der seitlich in die Linse des Medianauges implantiert wurde. Eine indifferente Platin-Elektrode ( $100\mu$ m Durchmesser) befindet sich in der Kutikula rostral zwischen den beiden Medianaugen. Das Signal wird verstärkt und zu einem Oszillographen und Bandgerät geleitet. Maxima der Amplituden zeigen einen gut ausgeprägten circadianen Rhythmus (rechts, grün). Die Maximalamplitude des ERG nach den alle 30 Minuten gegebenen Lichtblitzen ist während der Nachtzeit fünf mal empfindlicher als während der Tagzeit. Nach Fleissner (1974). E286J/erg-scorpion

Die circadianen Modulationen des visuellen Systems werden durch circadiane Oszillatoren im Protocerebrum des Gehirns erzeugt. Die genaue Lage dieser circadianen Uhren ist noch nicht bekannt. Anatomische und physiologische Ergebnisse lassen vermuten, dass die Medulla ein Kandidat ist (Chamberlain and Barlow (1980), Eisele et al. (1982)). Die Oszillatoren sind paarig und durch laterale neuronale Konnektive eng miteinander gekoppelt, sodass die efferente Aktivität beider Schrittmacher synchronisiert ist (Barlow et al. (1977)). Die Synchronisation geht verloren, wenn die Verbindung im Protocerebrum durchtrennt wird, aber die Aktivität bleibt erhalten. Die Zellkörper der efferenten Fasern liegen im Protocerebrum und scheinen neurosekretorisch zu sein. Die Zellkörper sind entweder miteinander gekoppelt oder erhalten synchrone Eingänge von der Uhr. Die Somata der efferenten Fasern enthalten wahrscheinlich nicht die Oszillatoren. Vielmehr scheinen diese (bisher unbekannten) Oszillatoren einen neuronalen Schaltkreis mit den Somata der efferenten Fasern zu bilden. Die Uhr beeinflusst die Empfindlichkeit der Lateralaugen nur während eines bestimmten Zeitfensters in der Nacht.

Die efferenten Signale zu den Lateralaugen und zu den ventralen Photorezeptoren bestehen aus dem gleichzeitigen Feuern von zehn bis zwanzig kleinen Fasern im optischen nerven (Fahrenbach (1973)). Im Lateralauge arborisieren die efferenten Fasern sehr stark und enden an retinulären, exzentrischen und pigmentierten Zellkörpern (Fahrenbach (1981)). Die efferenten Fasern enden im ventralen Photorezeptor-Organ an den Photorezeptorzellen (Calman and Chamberlain (1982)). Für die Medianaugen gibt es bisher keinen Informationen.

Der circadian Rhythmus der ERG-Amplitude bleibt im Dauerdunkel für mindestens ein Jahr erhalten. Die Periodenlänge ändert sich während dieser Zeit nicht (Barlow (1982)).<sup>10</sup>Jahresperiodische und monatliche Änderungen in der Empfindlichkeit des Ventralauges wurde beobachtet (Ross-Fahrhang and X (1990)).

Lichtpulse verschieben den Rhythmus je nach Phase verschieden stark. Das Phasenverschiebende Licht wird wahrscheinlich über die Lateralaugen wahrgenommen. Der ERG-Rhythmus kann aber auch verschoben werden, wenn das *Telson* belichtet wird. Die Phasenverschiebungen ergeben eine Phasenresponsekurve, wie man sie normalerweise bei anderen Arten mit Dunkelpulsen erhält, mit Verfrühungen in der frühen subjektiven Nacht und Verzögerungen in der späten subjektiven Nacht (Bernal-Moreno et al. (1996), Lajoie et al. (1997)).

Die circadiane Uhr im Protocerebrum ändert ferner die Struktur und Funktion der Retinazellen<sup>11</sup>. Die Gestalt der Photorezeptor- und Pigmentzellen, die Pigmentwanderung<sup>12</sup>und Lichttransduktion<sup>13</sup> sind betroffen (Barlow et al. (1980),Chamberlain and Barlow (1977)). Das Gesichtsfeld der Ommatidien vergrößert sich<sup>14</sup>(Chamberlain and Barlow (1979)). Die-

<sup>14</sup>Das Diaphragma, das durch die distalen Pigmentzellen gebildet wird, ist am Tage eng  $(17\mu m$  Durch-

 $<sup>^{10}</sup>$ Für Einzeltiere ist die Freilauf-Periode unterschiedlich und liegt zwischen 22.2 und 25.5 Stunden. Der Mittelwert ist 23.9 $\pm$  0.7h.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup>Im Lateralauge von Limulus gibt es große und kleine Photorezeptorzellen. Nur die großen ändern sich (Herman (1991))

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup>Pigmentzellen bewegen sich während der Nacht voneinander weg. Dadurch wird der Durchmesser des Diaphragmas größer. Die Retinulazellen sind näher an der Basis der Linse. Das Rhabdomer ist 36% kürzer und 34% breiter. In Querschnitten sehen die einzelnen Strahlen des Rhabdomers gefaltet aus. Im Längsschnitt sind sie gefaltet.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup>Die Form der Quantensprünge ändert sich mit der Tageszeit, während die Ruhepotentiale und Widerstände der Photorezeptor-Membran sich nicht ändern. Die Impulsrate der Neurone zweiter Ordnung, die exzentrischen Zellen, ändert sich ebenso wenig im Lauf des Tages.

se Uhr reguliert auch photo-mechanische Bewegungen innerhalb der Photorezeptoren, die Pigmentverteilung, die tägliche Erneuerung der Photorezeptor-Membranen<sup>15</sup> (Batra and Barlow (1990), Calman and Chamberlain (1992)). Alle diese Wirkungen erhöhen die Empfindlichkeit des visuellen Systems während der Nacht. Die zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen sind noch nicht gut bekannt (Battelle et al. (1998a))<sup>16</sup>.

Diese morphologischen Änderungen geschehen auch im Dauerdunkel. Wird der optische Nerv durchtrennt, verschwinden die zyklischen Änderungen und die Ommatidien bleiben im Tag-Zustand. Wird dem Stumpf ein elektrischer Pulse gegeben, wird der Nachtzustand induziert. Efferente Fasern sind daher für die strukturellen Änderungen verantwortlich. Der Gesichtswinkel der einzelnen Ommatidien verändert sich von  $6^0$  am Tage auf  $13^0$  während der Nacht. Das lässt sich auch durch elektrische Reizung induzieren: Die Aktivität der efferenten optischen nerven kontrolliert also die Gesichtswinkel. Diese und andere Änderungen erlauben es den dunkel adaptierten Ommatidien, 30 bis 100 mal empfindlicher zu werden. Die Quantenausbeute wird in der Nacht erhöht, während sich die räumliche Auflösung verringert.

Einzelne Limulus Photorezeptoren wurden in vivo für einige Tage im Dauerdunkel gehalten und Änderungen in physiologischen und Membran-Eigenschaften untersucht. Wahrscheinlich werden Ionenkanäle in den Membranen beeinflusst, wodurch die Lichtempfindlichkeit erhöht wird (Kaplan et al. (1990)). Elektrische Reizung induziert den empfindlicheren Nachtzustand. Unter diesen Bedingungen werden schnelle Lichtänderungen weniger gut entdeckt, aber die Empfindlichkeit gegenüber Licht ist höher (Batra and Barlow (1990)). Auf diese Weise spielt die circadiane Uhr eine wichtige Rolle, dem Tier zu helfen, sich an die Lichtbedingungen der Umwelt anzupassen.

Die circadiane Uhr erhöht auch die Lichtempfindlichkeit der medianen Ozellen für Wellenlängen zwischen 400 und 700 nm (Eisele et al. (1982)). Die Empfindlichkeit gegenüber ultraviolettem Licht ist jedoch nicht geändert, obwohl die Ozellen sehr empfindlich gegenüber UV sind (Barlow et al. (1980)). Zusätzlich gestattet die circadiane Uhr einem Photoreceptororgan, die Empfindlichkeit eines anderen zu erhöhen. Das geschieht nur in der Nacht, nicht am Tage (Barlow et al. (1980)).

Sogar isolierte Photorezeptoren (der größere Typ) der ventralen Augen ändern im Dunkeln und im Licht ihre Form. Im Dunkel-adaptierten Zustand sind die Microvilli klein und regelmäßig angeordnet (manchmal Kristall-artig). Im Licht-adaptierten Zustand sind sie dagegen viel dicker und ungeordnet. Der Übergang von einem Zustand in den anderen geschieht

messer). Der Abstand der retinularen Zellen zur Linse beträgt  $30 \,\mu m$ . Auf diese Weise wird die Lichtmenge begrenzt, die ins Auge gelangt. Im Querschnitt sieht man Anhänge proximater Pigmentzellen mit großen Körnchen. Sie liegen zwischen benachbarten retinularen Zellen am Ende des rhabdomerischen Sterns. Kleinere Pigmentkörnchen im Cytoplasma der retinularen Zellen finden sich nahe der Kanten der Rhabdomeren (Barlow et al. (1980)).

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup>So genanntes Membran-Abwerfen. Die Rhabdomeren werden mit dem ersten Licht des Tages abgebaut und erneuert. Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen werden untersucht. Rhodopsin absorbiert das Licht über die Phospholipase C/Diacylglycerat/Proteinkinase C-Kaskade. Es erfordert auch eine erhöhte cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Abgabe durch Inositol Triphosphat. Das rhythmische Abwerfen ist ein homöostatischer Mechanismus, um die Quantenausbeute konstant zu halten. Dieses Abwerfen fehlt bei Tieren in der Tiefsee, wo es keine Lichtänderungen gibt (Chamberlain (1998)).

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup>Ein Anstieg in der cAMP Konzentration in Photorezeptoren und Phosphorylierung eines für das visuelle System spezifischen Proteins (Myosin III) ist wahrscheinlich in einigen der von der Uhr kontrollierten Änderungen beteiligt (Battelle et al. (1998b)). Cytoskelett-Mechanismen nehmen an der Kontrolle der Apertur und der Rhabdomen-Gestalt, der Pigmentbewegung und des Abwerfens der Rhabdomenmembran teil (Calman and Chamberlain (1992)).

rasch und ist nach 30 Minuten beendet. Das zeigt, das die aufbauenden und abbauenden Phasen der Rhabdomen-Erneuerung auch isolierten Rhabdomen stattfinden können. Es ist dazu keine efferente Aktivität nötig. Licht und Dunkelheit genügen bereits.

Was ist die Bedeutung der circadianen Kontrolle der visuellen Empfindlichkeit bei Limulus? Der Sehsinn wird im täglichen Leben von Limulus nicht besonders stark benutzt. Er ist jedoch wichtig, um Partner zu finden. Während der Paarungszeit werden männliche Limulus visuell von Weibchen oder dummies angelockt. Sie erkennen Objekte während der Nacht fast genauso gut wie während des Tages. Das Auge adaptiert an die geänderten Lichtbedingungen und kann auf diese Weise die enormen Unterschiede kompensieren (Barlow et al. (1982), Powers et al. (1991), Herzog et al. (1996), Herzog et al. (1997)).

# 20.16 Formänderungen, Pigmentänderungen und Wanderungen von Chloroplasten

Wie Tiere sind auch Pflanzen mit dem Problem hoher Lichtintensitäten zu bestimmten Zeiten des Tages, des Jahres oder besonderer Situationen konfrontiert (zum Beispiel Ebbe bei Meeresalgen). Sie mussten Gegenmaßnahmen während der Evolution treffen, die wirksam genug waren, um Schaden vom photosynthetischen System abzuwenden. Einige Beispiel werden im folgenden gebracht.

Bei mehreren Algen wurden Chloroplasten beobachten, die wandern oder ihre Gestalt oder Pigment-Konzentration ändern (Mitrakos et al. (1957)). Die Ereignisse können unter Kontrolle eines circadianen Rhythmus sein. Das wurde im Fall der Chloroplastenwanderung bei *Ulva*  (Britz and Briggs (1976)) und bei Acetabularia (Koop et al. (1978)) gezeigt, im Fall der Formänderung von Chloroplasten (Vanden Driessche (1966)) und in der molekularen Struktur (Vanden Driessche et al. (1976)).

Halimeda ist besonders geeignet für solche Untersuchungen, da durch die coenocytische Struktur und das Calcium carbonate Skelett die Chloroplasten lange Strecken wandern können. Ein circadianer Rhythmus der Chloroplastenwanderung wurde bei Halimeda distorta durch Videoaufnahmen registriert (Drew and Abel (1992)). Im normalen 12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel sind die Segmente den ganzen Tag über grün, werden unmittelbar nach Ende des Lichtes farblos, und bleiben dann fast die ganze Nacht weiß, bis sie einige Stunden vor der Morgendämmerung wieder grün werden. Bei Lichtbeginn sind sie daher schon ziemlich grün. Im Dauerdunkel gibt es einen ähnlichen Zyklus, allerdings mit geringerer Amplitude und einer Periode von etwa 23 Stunden. Er hält mindestens 7 Tage an. Allerdings unterscheidet sich dieser Zyklus stark vom normalen, da die Segmente nicht grün bleiben, wenn das Licht morgens nicht an geht. Sie werden stattdessen unmittelbar danach wieder bleich. Umgekehrt werden die Segmente im Dauerlicht zu keiner Zeit bleich. Das rhythmische Wieder-Erscheinen der Chloroplasten vor der Morgendämmerung und ihr Verschwinden danach scheint demnach von einem endogenen Rhythmus kontrolliert zu sein, der unabhängig vom Licht ist. Licht hemmt völlig, aber reversibel, die Komponente des Zyklus, die für das zurückziehen des Chloroplasten zuständig ist. Dieses Verhalten der Chloroplasten von Halimeda ähnelt sehr stark dem der verwandten Alge Caulerpa (?), unterscheidet sich aber stark von dem einer anderen intensiv untersuchten, aber nicht verwandten siphoren Grünalge, nämlich Acetabularia. Bei ihr bleibt der circadiane Rhythmus der Chloroplastenwanderung im Dauerlicht erhalten (Koop et al. (1978)).

Bei Dictyota dichotoma, einer Braunalge, werden die Chromatophoren bei hohen Lichtintensitäten von den periklinen (Position von vorn) zu den antiklinen Wänden der Thalluszellen (Profil von der Seite) verlagert. Dieser Wechsel in der Position der Phaeoplasten kann in Licht-Dunkel-Zyklen und unter Dauerlicht- und Dauerdunkel-Bedingungen beobachtet werden (Nultsch et al. (1984), Abbildung20.21). Der Rhythmus lässt sich auch in der isolierten oberen oder unteren corticalen Zellschicht (der Thallus von Dictyota dichotoma besteht nur aus drei Zellschichten, einer inneren farblosen Medullarschicht und einer oberen und unteren pigmentierten corticalen Zellschicht). Es wird vermutet, dass die Algen auf diese Weise vor hohen Lichtintensitäten während der Ebbe geschützt werden.

## 20.17 Geschichte des Photoperiodismus

Die Tageslänge ändert sich im Jahreslauf besonders in den Äquator-ferneren Gebieten der Erde stark. Das hat enorme Einflüsse auf Klima, Umwelt und Lebewesen. Auch die Menschen werden davon stark betroffen. Sie haben sich deshalb von jeher damit beschäftigt. Winter- und Sommersonnenwende wurde in Riten gefeiert. Eine der ersten wissenschaftlichen Leistungen der Menschheit war die Berechnung und Voraussage der Jahreszeiten. Die Tageslänge spielt bei diesen Berechnungen eine entscheidende Rolle. Auch unsere Kalender beruhen darauf.

Die Bedeutung der Tageslänge für die Organismen wurde aber erst relativ spät zu Beginn des 19. Jahrhunderts entdeckt, obwohl "Yogai" Singvögel bereits im alten Japan durch künstlichen Langtag vorzeitig zur Geschlechtsreife und damit zum Singen gebracht wurden. Im folgenden wird ein kurzer Überblick über die Geschichte des Photoperiodismus gegeben (Evans (1969), Chailakhyan (1968)):

- Henfrey (1852) vermutet, dass die Tageslänge als Funktion der geographischen Breite Bedeutung für die natürliche Verbreitung der Pflanzen und für ihre Entwicklung haben kann.
- Kjellman (Kjellman (1878), Kjellman (1879)) zeigt bei Versuchen am Polarkreis, dass sich Pflanzen im Langtag schneller entwickeln. Er hat aber die Photosynthese als Ursache dafür nicht ausgeschlossen.
- Bailey (1892) benutzt 'Elektrohortikultur' für Untersuchungen und zeigt, dass bestimmte Pflanzen verfrüht blühen, wenn der Tag durch elektrische Lampen künstlich verlängert wird. Voraussetzung dafür war die Erfindung der elektrischen Lampe durch Edison (1879).
- (Tournois (1911), Tournois (1912)) induziert Blühen bei Humulus und Cannabis im Kurztag. 1911 findet er verfrühtes Blühen bei im Winter gesäten Pflanzen. Er zeigt, dass weder die Temperatur noch die Feuchte oder die Samen-Herkunft dafür verantwortlich sind. 1912 experimentiert er mit natürlichem Tageslicht, Dauerlicht (Glühlampen) und 6 h Lichtperioden. Unter 6 h Lichtperioden wuchsen die Pflanzen am langsamsten, blühten aber am frühesten. Er zieht die Tageslänge in Betracht, schließt aber auf Lichtmenge als Ursache. 1913 zeigt er, dass die Lichtintensität ohne großen Einfluss ist, sondern der Kurztag (=lange Nacht!) verantwortlich ist. Er plante weitere Versuche, starb aber kurz nach der Veröffentlichung seiner Arbeit im ersten Weltkrieg an der Front.
- Klebs (1913) untersuchte zur gleichen Zeit



Abbildung 20.21: Circadiane Änderungen der Transmission des *Dictyota dichotoma* Thallus. Die Transmission des Lichtes wurde mit einem Mikrophotometer mit Licht von  $10^{-4}Wm^{-2}$  bei einer Wellenlänge von 439 nm gemessen. Die Transmission ist ein Maß für die Lage mehr antikline oder perikline Lage der Chromatophoren. Die obere Kurve (rot) zeigt den Rhythmus im Dauerlicht, die Kurve in der Mitte (blau) bei physiologischer Dunkelheit (schwaches blaues Licht bei  $10^{-4}Wm^{-2}$ ) und die untere Kurve (grün) den Rhythmus einer isolierten corticalen Zellschicht. Nach Nultsch et al. (1984). D286H /dictyota transmittance

die Rosettenbildung bei Sempervivum funkii. Er benutzte Glühlampen und zeigte, dass die Pflanzen im Winter durch Langtag zum Blühen gebracht werden können. Licht war in diesem Fall 'katalytischer', nicht Ernährungsfaktor.

- Garner und Allard entdeckten zwischen 1918 und 1920 den 'Winterfaktor' bei einer Riesenform ('Maryland Mammoth') des Tabaks (Garner and Allard (1920)). Die Pflanzen wurden 3-5 m hoch, blieben aber im Sommer vegetativ. Im Winter blühten sie dagegen schon bei 1 m Höhe. Auf der Suche nach diesem 'Winterfaktor' wurden alle möglichen Hypothesen aufgestellt wie beispielsweise die Intensität und Zusammensetzung des Lichtes. Die Mutante 'Maryland Mammoth' wurde dann in einer 'primitiven Hundehütte nach eigenem Entwurf' einer Tageslänge von nur 7 Stunden ausgesetzt. Sie kamen dadurch zum Blühen. Damit war nachgewiesen, dass die die Tageslänge der entscheidende Faktor bei der Blühinduktion war. Es wurde ferner gezeigt, dass Sojapflanzen unabhängig vom Zeitpunkt der Aussaat mehr oder weniger zur gleichen Jahreszeit zum Blühen kamen. Auch Rettich, Karotten, Salat, Wintergerste reagierten mit Blühen auf die Tageslänge. Die Autoren schlugen für diesen Befund den Ausdruck 'Photoperiodismus' vor. Die sehr lesenwerte Arbeit wurde beinahe für eine Veröffentlichung abgelehnt, da sie angeblich nicht genügend Neues enthalte.
- Klippart (1857) untersuchte die Vernalisation von Getreide. Winterweizen blüht nur, wenn er für einige Zeit niedriger Temperatur ausgesetzt wird. Die Untersuchungen wurden später von Gassner (1918) an Petkus-Roggen (Winterroggen) fortgesetzt. Maksimov (1924) undLysen-

ko (1932) betonten, dass die reproduktive Entwicklung und das Wachstum getrennte Prozesse sind (was allerdings schon von MacDougal (1903) gefunden worden war). Gregory and Purvis (1936) setzten diese Untersuchungen fort.

• Went (1959) entdeckt den Thermoperiodismus.

Der Photoperiodismus wurde auch als ein Hauptfaktor für die jahreszeitliche Steuerung tierischen Verhaltens entdeckt:

- Schäfer (1907) weist auf die Tageslänge und ihre Bedeutung für den Vogelzug hin.
- Marcovitch (1924) untersuchte den Saisondimorphismus bei der Erdbeerwurzelblattlaus und bekam experimentelle Hinweise für eine photoperiodische Reaktion.
- Rowan (1926) untersucht bei Vögeln (*Junco hyemalis*) Zugverhalten und Gonadenreifung und fand photoperiodische Steuerung.
- Kogure (1933) entdeckt die Insekten- Diapause bei *Bombyx*, einem Kurztag-Tier.
- Sabrosky et al. (1933) findet im gleichen Jahr bei Heuschrecken photoperiodische Steuerung der xx.
- Baker (1935) beobachtet bei Stechmücken, dass die Diapause photoperiodisch beendet wird.

Damit waren eine ganze Reihe von Phänomenen zum Photoperiodismus und Thermoperiodismus beschrieben und es kamen in den folgenden Jahren viele weitere hinzu. Gleichzeitig begann die Suche nach den physiologischen Grundlagen der photoperiodischen Reaktionen. Bei der Blühinduktion durch Vernalisation wurde gezeigt, dass dafür das Gewebe im Apex verantwortlich ist (Curtis and Chang (1930)). Die Bildung von Kartoffelknollen (Razumov (1931)) und Blüten (Cosmos, Garner (1948)) wird dagegen über die Blätter induziert. Offenbar wird durch geeignete Photoperioden eine Substanz gebildet, durch die Blüten photoperiodisch induziert werden (Knott (1934)). Sachs forderte schon 1865 ein Blühhormon als Grundlage der photoperiodischen Induktion (Sachs (1865)). Nachdem Went (1928) Auxin als Pflanzenhormon entdeckte, verfolgte man diese Vermutung intensiv.Chailakhyan (1936b) schlug dafür den Namen 'Florigen' und später Anthesin vor (Chailakhyan (1970)). Er, Moshkov und Psarev (Chailakhyan (1937), Moshkov (1936), Psarev (1936)) zeigten, dass die Blätter der Ort sind, an denen dieses Hormon gebildet wird, bevor es zum Apex transportiert wird, um dort die Umstimmung zur Blüte zu bewirken. Mit Pfropfexperimenten wurde die Hypothese weiter erhärtet (Kuijper and Wiersum (1936), Chailakhyan (1937)). Der photoperiodische Reiz zur Blütenbildung der tagneutralen Sonnenblume Helianthus annuus konnte auf die Kurztagpflanze Helianthus tuberosus (Artischocke) übertragen werden. Die Kurztagpflanze Nicotiana tabacum Maryland Mammoth wurde zum Blühen gebracht, indem man sie auf die Langtagpflanze Nicotiana tabacum aufpfropfte (Moshkov (1937)). Spätere Versuchen ergaben, dass Kurz- und Langtagpflanzen das gleiche Blühhormon benutzen.

Weitere wichtige Stationen auf dem Weg photoperiodischer Untersuchungen waren Arbeiten von Lincoln et al. (1964) (Florigensäure), Gregory (1936), Hamner and Bonner (1938) (Rolle der Dunkelperiode, Störlicht in der Mitte der Dunkelperiode macht einen Kurztag zum Langtag), Denffer (1950) (kein Blühhormon, sondern Entfernung einer Hemmung zum Blühen, ?), Rolle der Dunkelperiode, Störlicht in der Mitte der Dunkelperiode macht einen Kurztag zum Langtag), Pfropfversuche (Lona (1959)). Diese Versuche beschäftigten sich alle mit den photoperiodisch gesteuerten Reaktionen und ihren Mechanismen. Zwei weitere Fragen waren wichtig:

- 1. Welches Licht wirkt photoperiodisch und welche Pigmente nehmen es auf?
- 2. Wie wird die Tageslänge gemessen?

Bei zahlreichen photomorphogenetischen Prozessen spielt das hellrote und dunkelrote Licht eine wichtige Rolle. Das zugrunde liegende Pigmentsystem wurde als Phytochrom bezeichnet (Butler et al. (1959)). Es spielt unter anderem bei der Etiolierung, Samenkeimung und Blühinduktion eine Rolle. Seine Chemie wurde 1966 aufgeklärt (Siegelman et al. (1966)). Inzwischen ist bekannt, dass es eine Reihe verschiedener Phytochrome mit unterschiedlichen Eigenschaften gibt (Unterabschnitt 20.13).

Die circadiane Rhythmik, die bereits 1729 von Mairan (1729) entdeckt wird, soll nach Bünning (1936) Grundlage der Zeitmessung photoperiodischer Reaktionen sein: 'Der Photoperiodismus musste entdeckt werden, um einen selektiven Vorteil für die circadiane Rhythmik zu finden'. Carr (1952), Melchers (1956) und zahlreiche andere Pflanzenphysiologen untersuchen die Zusammenhänge. Später arbeiten Pittendrigh (1981), Hamner und Bonner (Hamner and Bonner (1938)) und andere am Problem der photoperiodischen Zeitmessung. Wie Kurzund Langtagpflanzen für photoperiodische Reaktionen die Zeit messen, wurde zunächst sehr allgemein, später detailliert in Modellen diskutiert. Die Bünning-Hypothese und neue Ideen und Modelle werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.

### 20.18 Modelle für die photope- 20.18.1 Sanduhrmodell riodische Steuerung

Photoperiodische Reaktionen sind unter Organismen weit verbreitet und Beispiel wurden bereits vorgestellt (siehe Kapitel 13). Wie letztlich die Tageslänge zu einer photoperiodischen Reaktion führt, wurde intensiv experimentell untersucht. Da es sich dabei um komplizierte Verhältnisse handelt, wurden auch Modelle vorgeschlagen, um die zu Grunde liegenden formalen Prinzipien und Mechanismen zu beschreiben.

Eine der dringendsten Fragen ist, wie die photoperiodische Information der Umwelt (das heißt, die Tages- oder Nachtlänge oder beide) zur photoperiodischen Reaktion führen (zum Beispiel Blühinduktion). Im folgenden werden Modelle zum Photoperiodismus vorgestellt:

- Die Sanduhr-Messung.
- Die Bünning-Hypothese, nach der circadiane Rhythmen die photoperiodische Zeitmessung bewerkstelligen. Hinweise auf Richtigkeit der Bünning-Hypothese und kritische Tests, Ergebnisse, die gegen die Bünning-Hypothese sprechen oder sie modifizieren.
- Das Modell der externen Koinzidenz.
- Rückkopplungsmodelle.
- Das Modell der internen Koinzidenz.
- Resonanz Modell.
- Amplitudenmodelle.
- Der photoperiodische Zähler von Saunders und Lewis.

Eine Sanduhr wurde in früheren Zeiten benutzt, um einen bestimmten Zeitabschnitt zu messen, zum Beispiel eine Stunde für eine Schiffswache oder 4 Minuten, um ein Ei zu kochen. Sie besteht aus zwei Glasblasen, die mit einem engen Hals miteinander verbunden sind. Ein der Blasen ist mit feinem Sand gefüllt. Wird die Sanduhr umgedreht, läuft der Sand durch den Hals. Das dauert eine bestimmte Zeit, die vom Durchmesser des Halses und der Sandmenge abhängt.

Wenn ein Organismus die Dunkelperiode misst, könnte er dazu einen Sanduhr-Mechanismus verwenden. Mit Beginn der Dunkelheit könnte ein Prozess in Gang gesetzt werden, der dann durch das Ende der Dunkelperiode (Beginn der Lichtperiode) beendet wird. Wird während dieses Vorgangs eine Substanz produziert, dann würde ihre Menge proportional zur Länge der Dunkelperiode sein. Erreicht die Konzentration eine bestimmte Schwelle (zum Beispiel nach 12.5 Stunden), könnte in diesem Fall eine photoperiodische Reaktion (wahrscheinlich über eine Reihe anderer Prozesse) induziert werden.

Die photoperiodische Reaktion würde dann durch alle Dunkelperioden induziert werden, die länger als die Schwelle sind. Dunkelperioden kürzer als diese *kritische Dunkelperiode* würden unwirksam sein. Ein Beispiel ist in Abbildung 20.22 gezeigt. In ihr ist die photoperiodische Induktion von Morphen bei *Megoura* illustriert (Lees (1973)).

Wird eine ziemlich lange Dunkelperiode gegeben, und Gruppen von Blattläusen zu bestimmten Zeiten während der Dunkelperiode für eine Stunde belichtet, würde der Denkprozess durch den Lichtpuls beendet werden. Käme das Licht zu früh, würde die kritische Dunkelperiode noch nicht erreicht sein. Die photoperiodische Reaktion würde nicht stattfinden. Alle Lichtpulse nach dieser kritischen Zeit würden dagegen die photoperiodische Reaktion nicht unterbinden (unterer Teil der Abbildung 20.22). Mit diesem Experiment könnte getestet werden, ob eine Sanduhr beteiligt ist.



Abbildung 20.22: Sanduhrmodell der photoperiodischen Zeitmessung: Mit Beginn der Dunkelheit beginnt eine Sanduhr zu laufen. Ihre Funktion ist durch die rote ansteigende Linie dargestellt. Ist die Dunkelperiode lang genug, erreicht die Funktion einen Schwellenwert (schwarze Linie durch 0) und ein Prozess wird in Gang gesetzt (grüne Linie), der zu einer photoperiodischen Reaktion führt. Am Ende der Dunkelperiode wird die Sanduhr-Funktion zurückgesetzt und kann wieder neu starten mit einer neuen Dunkelperiode. Nach Rensing et al. (2001); siehe auch die experimentellen Daten von Lees (1973). E190X/hourglassmodel

#### 20.18.2 Bünning-Hypothese, externes Koinzidenzmodell

Bünning (1936) schlug vor, dass bei der Zeitmessung photoperiodischer Reaktionen eine circadiane Uhr verwendet wird. Wie die Blühinduktion nach dieser Vorstellung geschieht, ist in Abbildung 20.23 erklärt. Licht hat demnach zwei Funktionen: Es synchronisiert die circadiane Uhr, und, je nach der photoperiodischen Konstellation der Jahreszeit (Langtage oder Kurztage) und der photoperiodisch Situation des Organismus (zum Beispiel Langtagpflanze oder Kurztagpflanze) induziert es die photoperiodische Reaktion oder nicht.

Die interne Oszillation mit ihren verschiedenen circadianen Phasen (photophil und skotophil) fällt mit dem externen Rhythmus des Licht-Dunkel-Zyklus je nach der Tageslänge in verschiedener Weise zusammen. Wie der äußere Licht-Dunkel-Zyklus die innere Uhr synchronisiert, kann unterschiedlich sein. Es hängt davon ab, ob der Lichtbeginn oder das ende der Lichtperiode die Phase stärker beeinflusst. Im Beispiel der Abbildung 20.23 ist es der Beginn der Lichtperiode, der die Phase im Langtag und im Kurztag bestimmt. Es ist aber realistischer, dass sowohl Licht-an als auch Licht-aus beim Setzen der Phase eine Rolle spielt. Das wird im nächsten Unterabschnitt erklärt.

Bünnings Hypothese wurde so modifiziert, dass nur ein kurzer Abschnitt der Oszillation Lichtempfindlich ist (so genannte Licht induzierbare Phase  $\Phi_i$ ) und dass der externe Licht-Dunkel-Zyklus mit $\Phi_i$  in der richtigen Art koinzidieren muss (siehe Abbildung 20.24 und Pittendrigh (1964)). Dieses Modell wurde externes Koinzidenzmodell im Gegensatz zu dem internen Koinzidenzmodell genannt (siehe Unterabschnitt 20.18.3). Es gibt jedoch keinen fundamentalen Unterschied zwischen den beiden Modellen: Der externe Licht-Dunkel-Zyklus könnte durchaus einen inneren Licht-Dunkel-Rhythmus im Organismus hervorrufen, der mit der kritischen Phase der circadianen Uhr interagiert. Das ist die Situation im Rückkopplungsmodell, welches in Unterabschnitt 20.18.4 diskutiert wird.

#### 20.18.3 Interne Koinzidenz

Experimente mit Blütenblattbewegungen von Kalanchoe (Engelmann (1960)) brachten uns



Abbildung 20.23: Bünning-Modell der photoperiodischen Induktion des Blühens (oder anderer Prozesse). Licht hat zwei Funktionen: Es synchronisiert die circadiane Uhr auf den Licht-Dunkel-Zyklus. Die obere Kurve zeigt eine freilaufende Oszillation unter konstanten Bedingungen ohne Zeitgeber (Licht-Dunkel-Zyklus oder Temperatur-Zyklus). Die beiden unteren Kurven sind durch Licht-Dunkel-Zyklen (Langtag, Mitte, Kurztag, unten) auf den 24 Stunden Tag synchronisiert. Zweitens beeinflusst Licht das photoperiodische System unterschiedlich, je nachdem, ob Kurztag oder Langtag herrscht. Im Langtag fällt die lange Lichtperiode (weiße Fläche über der x-Achse) nicht nur mit der so genannten 'photophilen Phase' (Licht-lieben, roter Teil der Kurve) zusammen, sondern teilweise auch mit der skotophilen Phase ('Dunkelliebend', grauer Teil der Kurve). In diesem Fall wird in einer Langtagpflanze Blühen induziert, aber in einer Kurztagpflanze verhindert. Unter Kurztag wird die skotophile Phase nicht beleuchtet und eine Langtagpflanze wird nicht blühen. Kurztagpflanzen würden dagegen zum Blühen induziert. Nach Bünning (1983). D190B/externe-koinzidenz



Abbildung 20.24: Externes Koinzidenzmodell für photoperiodische Reaktionen. Licht synchronisiert die circadiane Uhr auf den äußeren Licht-Dunkel-Zyklus. Die Phase der Oszillation ist hier nicht auf Licht-an festgelegt. Obere Kurve (rot): Unter 14:10 Stunden Langtag. Unter Kurve (blau): Unter 3:21 Stunden Kurztag. Eine Licht-empfindliche Phase  $\theta_i$  des Oszillators über einem Schwellenwert muss mit Licht zusammenfallen, wenn es zu einer photoperiodischen Reaktion kommen soll. Nach Pittendrigh (1964). D190BB/phisubi

dazu, ein Modell der photoperiodischen Zeitmessung vorzuschlagen, in dem ein interner Rhythmus in einem Organismus durch den Beginn des Lichtes und ein anderer interner Rhythmus durch den Beginn der Dunkelheit induziert wird (Engelmann (1966), Engelmann (1967)). Die Überlagerung der beiden Rhythmen erhöht oder verringert die Amplitude der sich ergebenden Oszillation. Oszillationen mit hoher Amplitude führen zu photoperiodischer Reaktion. Um dieses interne Koinzidenzmodell zu erklären, wird die Blühinduktion von Kalanchoe im folgenden benutzt und die Blütenblattbewegung dient als Zeiger für die beiden unterschiedlichen Oszillatoren.

Wenn blühende Kalanchoe Pflanzen für mehr als 14 Tage im Dauerdunkel gehalten werden (was bei diesem Dickblattgewächs möglich ist; grünes Licht als physiologische Dunkelheit erleichtert das Wässern der Pflanzen und das Hantieren), zeigen die Blütenblätter keine Bewegung mehr und sind maximal geöffnet. Überträgt man die Blüten in Dauerlicht-Bedingungen, wird eine circadiane Blütenblatt-Bewegung in Gang gesetzt, die wir 'Licht an Rhythmus ´genannt haben (Abbildung 20.25). Werden blühende Kalanchoe Pflanzen für einige Tage im Dauerlicht gehalten, hören die Blüten auf, sich zu bewegen und sind fast völlig geschlossen. Überträgt man diese Blüten in Dauerdunkel-Bedingungen, wird ein circadianer Rhythmus der Blütenblatt-Bewegung gestartet, den wir 'Licht-aus Rhythmus ' nannten (Abbildung 20.25). Die Abbildung zeigt, dass das erste Maximum des Licht-an-Rhythmus 5 Stunden nach Übergang ins Licht auftritt, und das erste Maximum des Licht-aus Rhythmus 15 Stunden nach Übergang in Dunkelheit. Wird den Blüten eine Lichtperiode von 10 Stunden angeboten, überlagern sich die beiden Rhythmen so, dass das erste Licht-aus Maximum und das erste Licht-an-Maximum zusammenfallen. Das ist überraschenderweise die kritische Tageslänge der photoperiodischen Blühinduktion von Kalanchoe. Wir schlugen deshalb vor, dass die Überlagerung eines 'Licht-an-Rhythmus ´ und eines 'Licht-aus-Rhythmus ´ für die photoperiodische Reaktion (hier: Blühinduktion) verantwortlich ist.

#### 20.18.4 Rückkopplungsmodell und Photoperiodismus

Der wichtigste Punkt von Bünning 's Idee, dass eine circadiane Uhr für die photoperiodischen Reaktionen benutzt wird, ist, dass ein interner Oszillator in einem Organismus (1) durch den externen Licht-Dunkel-Zyklus synchronisiert wird und (2) je nachdem, ob die skotophile Phase in Dunkelheit fällt oder teilweise belichtet wird, eine Kette von Ereignissen induziert, zu einer photoperiodischen Reaktion führt oder nicht. Es gibt aber eine Reihe von Punkten, die nicht ganz klar sind und auf die teilweise schon beim Besprechen des externen Koinzidenzmodells zur Sprache kamen.

Einer dieser Punkte ist, wie der Oszillator durch den Licht-Dunkel-Zyklus synchronisiert wird. Im Beispiel der Kurztagpflanzen, wie es in Abbildung 20.23 gezeigt ist, nahm Bünning an, dass der Übergang von Dunkelheit nach Licht die Phase der Uhr setzt (die photophile Phase, rot in der Abbildung, fällt mit Lichtan des Langtages *und* des Kurztages zusammen). Das muss aber nicht so sein. Noch muss das Licht-aus die Phase setzen. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, dass die Synchronisation komplizierter ist. Wir werden darauf zurückkommen (siehe Abbildung 20.26).

Ein zweiter vager Punkt ist, welcher Teil des Zyklus des internen Oszillators in welcher Weise mit dem Licht-Dunkel-Zyklus interagiert. Auch das wurde im externen Koinzidenzmodell bereits angesprochen, aber nicht ausreichend.

Wir (Bollig et al. (1976)) haben ein Rück-



Abbildung 20.26: Simulationen von Oszillationen mit einem Rückkopplungsmodell (siehe Abbildung 8.10, wo 'Störungen' Licht sein würden). Es wurden verschiedene Licht-Dunkel-Zyklen verwendet, wie an der y-Achse gezeigt (LD 12:6, 12:18, 12:30, 12:42 Stunden). Der Modell-Oszillator wird durch einen Licht-Dunkel-Zyklus getrieben (auf einem Analogcomputer durchgeführt, bei dem verschiedene Licht-Dunkel-Zyklen in das Programm gefüttert wurden) und die sich ergebenden Werte wurden als Kurven dargestellt. Der Abstand  $\psi$  zwischen Licht-an (Änderungen zwischen grauer und weißer Fläche) zum nächsten Minimum erwiesen sich als Indikator der photoperiodischen Induktion (siehe Abbildung 20.28 und 20.27). Nach Bollig et al. (1976). D190Cm/pp-simulation



Abbildung 20.25: Internes Koinzidenzmodell der photoperiodischen Induktion des Blühens. Licht-an Rhythmus (rote Kurve) von Kalanchoe-Blüten (Kapitel 8) nach Übergang von 2 Wochen Dunkelheit DD (graue Schattierung, Blüten fast völlig geöffnet) in Dauerlicht LL (helle Fläche, Blüten öffnen sich weiter). Maxima des Licht-an Rhythmus 6 und 27 Stunden nach Lichtbeginn. Licht-aus Rhythmus (blaue Kurve, mittlerer Teil der Abbildung, Blüten maximal geschlossen) nach Übergang von einigen Tagen LL (hell) in DD (grau). Nächstes Maximum 18 Stunden nach DD-Beginn. Grüne Kurve: Blüten für einige Tage in DD, dann in 9 Stunden Licht und zurück ins Dunkle. Beide Rhythmen überlagern sich, Amplitude wird verstärkt. Längere und kürzere Lichtperioden ergäben kleinere Amplituden (nicht gezeigt). Kalanchoe wird durch 9:15 Stunden LD (hier gezeigt) maximal Blüh-induziert. Überlagerung eines Licht-an- und eines Licht-aus Rhythmus spiegeln die Stärken photoperiodischer Induktion in verschiedenen LD-Zyklen wider. D190BA/externe-koinzidenz

kopplungsmodell benutzt, das erst für die Beschreibung ultradianer Rhythmen und später für die von circadianen Rhythmen entwickelt wurde (Johnsson and Karlsson (1972), Karlsson and Johnsson (1972)), um diese Fragen zu beantworten. Der Modell-Oszillator wird durch den Licht-Dunkel-Zyklus getrieben (mit einem Analog-Computer simuliert, bei dem die verschiedenen Licht-Dunkel-Zyklen in das Programm gefüttert wurden) und die sich ergebenden Daten als Kurven dargestellt (siehe Abbildung 20.26). Eine Reihe von Experimenten zur Blühinduktion von Chenopodium rubrum wurden parallel zu den Simulationen durchgeführt, wobei die gleichen Kombinationen von Licht-Dunkel-Zyklen verwendet wurden. Wir versuchten, aus den Simulationen einen Indikator der photoperiodischen Induktion zu finden. Der Abstand zwischen Licht-an des LD-Zyklus und dem nächsten Minimum der Oszillation (das Zeichen wurde nicht beachtet) wurde  $\psi$ genannt und der Mittelwert aller  $\psi$ 's ergab eine ziemlich gute Voraussage der photoperiodischen Induktion (siehe Abbildung 20.27 und Abbildung 20.28).

### 20.19 Duftrhythmen

Blüten sind Organe der Pflanzen, die in vielen Fällen dazu dienen, Bestäuber wie Insekten oder Vögel oder Fledermäuse anzulocken. Düfte werden von Blüten oft nur zu bestimmten Tageszeiten abgegeben. Blüten, die durch nichtaktive Motten bestäubt werden, öffnen daher ihre Blüten in der Nacht und geben Düfte ab.

In einigen Untersuchungen wurde nachgewiesen werden, dass die Duftabgabe durch einen endogenen Rhythmus gesteuert wird. Zu diesen Pflanzen gehören vor allem Nachtblüher. In Pflanzen, die während des Tages blühen, wird der Rhythmus durch den Licht-Dunkel-



Abbildung 20.28: Simulationen (rote Kurve) und Experimente (blaue Kurve) zur Blühinduktion von Chenopodium rubrum Pflanzen Ökotyp 374 unter LD-Zyklen mit 6 Stunden Lichtperiode und verschiedenen Dunkelperioden (Abszisse). Die Blühinduktion (rechte y-Achse) und die  $\psi$  Werte (linke y-Achse) zeigen ein ähnliches Muster. Nach Bollig et al. (1976). D190E/ppsimulation-24h

Zyklus getrieben und nicht durch einen endogenen Rhythmus. Zu den Nachtblühern gehören auch eine Reihe von Caryophyllaceae. Die Blütenökologie und die Bestäubungsmechanismen bei Caryophyllaceen werden zur Zeit intensiv von Jürgens et al. (1996) untersucht. Die Duftabgabe vom echten Seifenkraut Saponaria officinalis hat Neugebauer (1997) im Rahmen einer Diplomarbeit mit Headspace-Methoden gaschromatografisch nachgewiesen. Die Pflanze wächst an Ruderalstellen besonders in Auenlandschaften in ganz Europa (nicht in den Alpen). Sie blüht vom Spätsommer bis weit in den Herbst hinein. Sie duftet sehr stark am Abend und in der Nacht. Die Anthese beginnt zwischen 20 Uhr und 22 Uhr Uhr. Die Blüten bleiben auch am Tage geöffnet (im Gegensatz zu Silene nocturnum, bei der sich die Blüten Tags schließen).

Um Duftproben zu sammeln, wurde eine besondere Apparatur verwendet (Matile and Altenburger (1988)), die in Abbildung 20.29 gezeigt und erklärt ist. Parallel zur Duftmessung werden die Blüten in der Küvette mit einer Videokamera registriert. und dann gaschromatografisch analysiert. Aus den Chromatogrammen konnten die Art und Mengen der abgegebenen Duftstoffe in den verschiedenen Zeitabschnitten bestimmt werden. Ein Gaschromatogramm des Headspaces von Saponaria officinalis ist in Abbildung 20.30 dargestellt. Daneben gibt es noch in geringer Menge etwa 40 weitere Substanzen, die nicht identifiziert wurden. Saponaria officinalis gibt sowohl im Licht-Dunkel-Wechsel als auch unter Dauerlicht Methylbenzoat und Benzaldehyd rhythmisch ab (Abbildung 20.31). Benzylcyanid war nicht zu allen Zeiten nachweisbar. Die Hauptkomponente Methylbenzoat hat ihr Maximum in der Dunkelperiode gegen 24 Uhr. Im Dauerlicht liegt das zweite Maximum später (bei 3 Uhr). Die Freilaufperiode wäre demnach etwa 27 Stunden. In der Arbeit sind Einzelheiten beschrieAbbildung 20.31: Rhythmische Abgabe von Methylbenzoat und Benzaldehyd durch Blüten von Saponaria officinalis im Licht-Dunkel-Wechsel (erstes Maximum, Dunkelperiode durch dunklen Balken, Lichtperiode durch hellen Balken über der Kurve markiert) und im Dauerlicht (rechter Teil der Abbildung). Nach Neugebauer (1997). E288n/duftrhythm

ben und einige interessante Beobachtungen, für die es sich lohnen würde, weitere Untersuchungen an dieser Pflanze durchzuführen. So könnte der Rhythmus des Benzaldehyds eine etwas andere Freilaufperiode haben als der des Methylbenzoats. Vielleicht haben die beiden Substanzen auch unterschiedliche Aufgaben beim Anlocken der Bestäuber.

### 20.20 Arrhythmie

Oszillationen können durch äußere Einflüsse wie zum Beispiel einen Anstoß einer schwingenden Schaukel beeinflusst werden. Die Wirkung hängt von der Phase ab, zu der angestoßen wurde. Bei biologischen Rhythmen wie zum Beispiel circadianen Uhren sind solche äußeren Einflüsse zum Beispiel Temperaturpulse, und einige Beispiele wurden gegeben. Die Wirkung solcher Pulse auf den Rhythmus als Funktion des Zeitpunktes (Phase) der Applikation wird normalerweise in Phasenresponsekurven (siehe zum Beispiel Abbildung 4.9, 6.10, 8.7, 8.4, 14.5, und 16.4) dargestellt. Es wurde zuerst im Fall des Schlüpfrhythmus von Drosophila pseudoobscura und später bei Rhythmen anderer Organismen wie der Blütenblattbewegung von Kalanchoe gefunden, dass ein starker Störpuls vor einem bestimmten Phasenpunkt in der Nacht (subjektive Mitternacht) gegeben den Rhythmus verzögert, wenn er danach gegeben wird, verfrüht. Wird dieser Puls genau zu diesem Zeitpunkt mit einer ganz bestimmten Stärke gegeben, verschwindet der Rhythmus. Dieser kritische Puls liegt am untersten Ende der stark wirkenden und am obersten Ende der schwach wirkenden Pulse. Der Unterschied zwischen einem starken und einem schwachen Puls ist in Abbildung 14.5 für den Schlüpfrhythmus von Drosophila erklärt (Winfree (1986)).

## 20.21 Genetik circadianer Rhythmen

Bereits 1935 zeigte Bünning, dass die circadianen Blattbewegungen zweier Varianten einer Bohnen-Population sich in ihrer Periodenlän-

Abbildung 20.27: Simulation von Oszillationen und Ergebnisse photoperiodischer Experimente mit verschiedenen Lichtperioden (x-Achse) und entsprechenden Dunkelperioden in 24 Stunden-Zyklen. Pflanzen des Ökotyp 374 von *Chenopodium rubrum* wurden im Dauerlicht angezogen und in drei Zyklen mit verschiedenen LD Zeiten gebracht. Der Prozentsatz blühender Pflanzen (grüne Kurve) ist zusammen mit dem  $\psi$  Wert der Simulationen (rote Kurve) gezeigt. Hohe Blühinduktion bis zu 12 Stunden, keine Induktion über 16 Stunden. Die  $\psi$  Kurve zeigt Ähnlichkeiten in ihrem Zeitverlauf. Einzelheiten in Bollig et al. (1976). D190D/pp-simulation-12h

Abbildung 20.30: Gaschromatogramm einer Headspace-Probe von *Saponaria officinalis* mit drei Hauptkomponenten: Benzaldehyd, Methylbenzoat und Benzylcyanid. Als Referenz diente n-Dodecan. Die Ausheizphase ist markiert. 287/chromatogramm ge um 3 Stunden unterschied. Diese Differenzen blieben erhalten, wenn die jeweiligen Varianten für vier Generationen mit sich selbst gekreuzt wurden. Bei Kreuzungen zwischen den Varianten blieb die jeweilige Verteilung der Periodenlängen normal. Bünning schloss daraus auf eine polygene Vererbung (Bünning (1932)).

Bruce (1970) untersuchte in den siebziger Jahren den circadianen Rhythmus phototaktischer Reaktionen bei Chlamydomonas. Für genetische Untersuchungen sind diese Algen günstig, weil sie haploid sind, nur ein kleines Genom von etwa 100 Mb besitzen und weil es zahlreiche Mutanten gibt (neuere Übersicht:Harris (1989)). Schon im Wildtyp zeigten sich Varianten der Periodenlänge. Bei Mutagenese wurde in 0.5 bis 2% der Fälle die Periodenlänge verändert. Meistens waren sie länger als im Wildtyp.Bruce (1972) isolierte vier Mutanten, per-1, per-2, per-3 und per-4. Ihre Periodenlänge war länger als die des Wildtyp (zwischen 26 und 28 Stunden. Die Mutationen lagen auf vier verschiedenen Loci und Kreuzungen zeigten, dass per-1 dominant, per-2 rezessiv und per-4 semi-dominant waren (Bruce and Bruce (1978)). Semi-dominant sind auch alle Mutanten von Drosophila und Neurospora crassa. Es gab bei Kreuzungen zwischen den Mutanten Periodenlängen bis zu 40 Stunden. Die Effekte sollten nach Bruce (1974) additiv sein 17 (wenn A eine Periodenlänge von  $\tau_{\scriptscriptstyle WT} + n$  hat und B eine Periodenlänge von  $\tau_{wT} + m$ , dann hat die Doppelmutante AB eine Periodenlänge von  $\tau_{WT} + (n+m)$ ). Demnach müssten die vier Mutanten das gleiche circadiane System beeinflussen. Nach Lakin-Thomas and Brody (1985) ist es aber wahrscheinlicher, dass die Effekte multiplikativ sind  $(\tau_A * \tau_A / \tau_{WT})$ . Es gibt keine epistatische Interaktion.

Stoffwechselmutanten wurden bei Neurospora crassa auf ihre Periodenlänge hin untersucht und in 10-15% der Fälle gefunden (Cote and X. (1997), Lakin-Thomas et al. (1990)). Interessant waren vor allem Mutanten, die den Fettsäurestoffwechsel betrafen, weil diese für Membranen und ihre Eigenschaften wichtig sind. Dazu gehören zum Beispiel die Lipid-Mutanten fat1, alt1 und fad4-7.

Eine neuere Zusammenstellung der genetischen Untersuchungen circadianer Rhythmen geben Somers et al. (1998). Arabidopsis thaliana wurde und wird genetisch intensiv untersucht (Übersicht Meierowitz and X (1994)). Seit man in diese Pflanze einen circadianen Zeiger eingefügt hat (cab2::luc), lässt sich der circadiane Rhythmus der Amplitude der cab2 Transkriptionsrate und der Menge an RNA nicht-invasiv als Lumineszenz mit einer empfindlichen Videokamera messen. Die Periodenlänge beträgt im Dauerlicht 24.5 und im Dauerdunkel 30-36 Stunden.

Diese Unterschiede in der Periodenlänge konnten benutzt werden, um blinde Mutanten zu isolieren, weil diese trotz Dauerlicht eine längere Periodenlänge hatten. Die Mutante hy1, die kein Chromophor für Phytochrom ausbildet, zeigt im Dauerlicht die Periodenlänge des Wildtyp von 24.5 Stunden. Das spricht für Lichteingänge zur Uhr über multiple Photorezeptoren (siehe Seite 20.13). Im blauen Dauerlicht ist die Periodenlänge kürzer als im Wildtyp. Phytochrom und Photorezeptoren müssten also interagieren, damit sich die längere Periode des Wildtyp ergibt. Die det1-1 Mutanten verhalten sich im Dauerdunkel, wie wenn sie sich im Dauerlicht befänden. Das betrifft nicht nur die Photomorphose, sondern auch das Verhalten der circadianen Uhr. Bei dieser Mutante ist also etwas beseitigt, was die Uhr schneller laufen lassen würde. Es zeigte sich, dass dieser Faktor im Lichteingangsweg ist und DET1 keine zentrale Komponente der Uhr ist. Die Mutante cop1-6 verhält sich ähnlich. Die Mutante det2 dagegen zeigt ein circadianen Ver-

 $<sup>^{17}</sup>$ wie auch *Neurospora crassa* (Dunlap (1993), Feldman and Hoyle (1976))

halten wie der Wildtyp. Bei ihr ist ein Enzym des Blaulicht-Rezeptor- Weges betroffen (Li (1998)); dieser Rezeptor-Weg ist also kein essentieller Bestandteil der Uhr.

Schließlich wurden auch Mutanten benutzt, die sich in ihrer Blühzeit vom Wildtyp unterschieden. Da die photoperiodische Zeitmessung über die circadiane Uhr geht (Bünning (1936)), sind solche Mutanten Anwärter für Unterschiede im circadianen System. Solche Mutanten sind elf (früher blühend), tagneutrale Mutanten (esd4, Periodenlänge kürzer als der Wildtyp), toc1 und spät blühende Mutanten (CO). Bei elf ist allerdings nur der Eingang zur Uhr betroffen, bei CO der Ausgang von der Uhr.

# 20.22 Sonnenkompass-Orientierung eines Strandflohkrebses

Küsten haben Zonen mit unterschiedlichen physikalischen und biologischen Eigenschaften ('Ökotonales System', Abb). Sie verschieben sich periodisch durch die Gezeiten und aperiodisch durch Stürme. In diesen Zonen lebt eine spezifische Fauna. Sie muss sich an diese ständig wechselnden Lebensbedingungen anpassen. Manche Organismen halten sich in spezifischen Zonen auf oder versuchen, diese zu erreichen. Andere dagegen durchwandern die Zonen und zeigen dabei unterschiedliches Verhalten.

Der Strandflohkrebs *Talitrus saltator* Montagu gehört zu den Amphipoden (*Malacostracae*). Er lebt am Strand in der Nähe der Hochwasserlinie. Tags vergräbt er sich im feuchten (nicht zu nassen) Sand. Er macht nachts bis zu 100 Meter Wanderungen ins Inland. Wird es zu trocken, flieht er zum Wasser. Dabei kann er die Sonne als Kompass benutzen, wie Spiegel-Versuche und Versuche mit künstlichen Sonnen (Lichtquellen) zeigen (Pardi and Papi (1952)). Dabei dient nur der Azimut und nicht die Höhe der Sonne zur Orientierung. Unterschiede im Azimut (geographische Breite, Jahreszeit, Nord- oder Südhalbkugel) werden mit einkalkuliert. Sie müssen nicht, wie bei Ameisen (Jander (1975)), erst erlernt werden.

Die Fluchtrichtung hängt von der Küstenrichtung ab und ist für die speziellen Populationen genetisch festgelegt. Die Sonnenwanderung wird einkalkuliert. Statt der Sonne kann auch das Muster des polarisierten Lichtes am Himmel zur Orientierung benutzt werden. Weitere Orientierungshilfen sind die Neigung des Strandes, Landmarken, ein Magnetkompass. Ohne diese zusätzlichen Hilfen ist die astronomische Richtungsweisung schlechter.

In der Nacht wird der Mond zur Orientierung benutzt. Das funktioniert auch noch nach einigen Tagen Dauerdunkel vor dem Test (Papi (1960)). Dabei wird zum Zeitmessen keine 'Sanduhr' benutzt, sondern ein Oszillator mit einer Periodenlänge von 24h50m (Enright (1972)).

### 20.22.1 Sonnen- und Mondorientierung am Äquator

Wie sich Talorchestia martensii orientiert, wurde am indischen Ozean in Somalia und Kenia untersucht. Die Tiere leben zwischen dem oberen Supralitoral und dem unteren Eulitoral. Sie sind an die dortigen Gezeiten mit einer tidalen und einer diurnalen Komponente angepasst. In Äquatornähe läuft die Sonne je nach Jahreszeit südlich oder nördlich. Somit gibt es starke Unterschiede im Azimut. Trotzdem können sich die Tiere nach einem Sonnenkompass orientieren. Zusätzlich wird eine Magnetorientierung benutzt.
## 20.23 Zeitreihen-Analyse

Um Rhythmen zu analysieren, werden so genannte Zeitreihen-Analysen verwendet. Leider ist die Literatur dazu oft ziemlich speziell und für den Laien nicht leicht zu verstehen. Visuelle Inspektion der Daten ist gewöhnlich der erste Schritt (Refinetti (1991)), aber oft sind die Rhythmen in den Daten versteckt und spezielle Methoden müssen angewendet werden. Gorton et al. (1989) untersuchten zum Beispiel Stomata-Rhythmen von Vicia faba Epidermis-Stücken und zeigten, wie man aus diesen ziemlich verwaschenen Daten Informationen über einen circadianen Rhythmus ziehen kann. Sie verwendeten dazu verschiedene Methoden wie gleitende Mittelwertbildung zum Glätten der Werte und Trendbereinigung. Maximum Entropie-Spektralanalyse (MESA, Ulrych and Bishop (1975)) wurde in dieser Arbeit und in neueren Publikationen statt der üblichen Fourier- und Periodogramm-Analyse-Methoden verwendet. Oft wird auch das chi-Quadrat Periodogramm von Sokolove and Bushell (1978) verwendet. Für neuere Methoden der Zeitreihen-Analyse siehe Ruf (1999). Empfohlen werden die folgenden Publikationen, um mit den verschiedenen Methoden der Zeitreihen-Analyse vertraut zu werden: Morgan et al. (1992), Enright (1981).

Praktische Beispiele zur Zeitreihen-Analyse biologischer Rhythmen geben Dowse and Ringo (1989), Aldrich (1990), A26 (n.d.).

Das Registrieren der lokomotorischen Aktivität von Tieren wird häufig verwendet, um Daten zur rhythmischen Kontrolle zu erhalten (siehe zum Beispiel Abbildung 3.1). Hier werden spezielle Methoden benutzt (Dowse and Ringo (1994)). Klemfuss and Clopton (1993) verglich sechs verschiedene Methoden, um die Periode circadianer Rhythmen zu bestimmen.

Die meisten Zeitreihen-Analyse-Programme funktionieren nur bei stationären Rhythmen:

Ihre Periodenlänge darf nicht mit der Zeit variieren. Das ist aber bei biologischen Rhythmen oft nicht der Fall. Hier wird die Methode der komplexen Demodulation empfohlen (Sing and Hegge (n.d.)). Sie zeigt die sich ändernden Perioden und eventuell vorhandene Phasenverschiebungen in einem Diagramm, das einem Aktogramm ähnelt, bei dem der Aktivitätsbeginn jeden Tages durch eine Gerade (wenn die Periode konstant bleibt), durch zwei Geraden (wenn Phasenverschiebungen vorhanden sind) oder durch eine Kurve repräsentiert, die die sich ändernde Periode wiedergibt.

Spezielle Methoden werden verwendet, um die Sonnen- oder Mondorientierung von Tieren zu analysieren (Batschelet (1965), Schmidt-Koenig (1975))

Es gibt Programmpakete zur Zeitreihen-Analyse für Computer (Martin and Brinkmann (1976b), Martin and Brinkmann (1976a), Martin et al. (1977), Diez-Noguera (2000), Mattes et al. (1991)). Das Buch von Press et al. (1989) enthält kurze Beschreibungen und Programme zur Zeitreihen-Analyse.

Zur Literatur über Zeitreihen-Analyse siehe Enright (1981), Pavlidis (1973).

## Literaturverzeichnis

- A1 n.d.. xx Shiftwork of policeman in Stockholm.
- A13 n.d.. Acetabularia Under constant conditions these cells did not influence the single cell.
- A14 n.d.. activity changes in various enzymes of the erythrocytes such as glucose-6phosphate-dehydrogenase, acid phosphatase, acetyl cholinesterase. However, different attempts to repeat these important findings were not successful so far.
- A15 n.d.. Synechocccus Trans-factors affect amplitude and phase position of the rhythm additionally.
- A17 1965. J econ Ent 58, 248.
- A18 n.d.. xx reef-heron, which flies with a tidal pattern to the sea.
- A19 n.d.. T comp in Excirolana.
- A21 1983. Sleep 6, 179.
- A21 n.d.. Newborns sleep 16 hours per day. They exhibit a rest-activity-cycle of 50-60 minutes. It soon couples with a digestive cycle with 3-4 hour periods. *SD 3317*.
- A22 n.d.. The time to fall asleep varies with age.
- A23 n.d.. ref missing.
- A26 n.d.. Practical examples for time series analysis of biological rhythms are given by.

- A27 n.d., hormone concentrations do change with the sleep-wake-cycle.
- A30 n.d.. Translational clock of Gony/-aulax polyedra: A cascade of clock proteins (CP's).
- A31 n.d.. Phodopus aR body weight, gonad weight.
- A32 n.d.. Photoperiodic induction of hibernation in Phodopus: The retina perceives photoperiodically active light and transfers the signal via the retinohypothalamic tract to the suprachiasmatic nucleus and further to the pineal organ. The pineal is induced to secret more melatonin. After.

A33 n.d.

- A34 n.d.
- A35 n.d.a.
- A35 n.d.b.

A36 n.d.. Molecular model of Drosophila.

- A38 n.d.
- A6 n.d.. Depressions are also found more frequently among women. Perhaps women need more light for the synchronization of their rhythms. *SD3903*.
- A8 n.d.. The following findings point to a multioscillatory system. *sd3185*.
- A9 n.d.. Lesions in POAH area disturb the temperature-regulation.

- Abran, D., Anctil, M. and Ali, M. 1994. Melatonin activity rhythms in eyes and cerebral ganglia of Aplysia californica. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 215–222.
- Adamec, L. and Krekule, J. 1989. Changes in transorgan electric potential in Chenopodium rubrum during the course of photoperiodic flower induction. *Biologia Plantarum* (*Prague*) **31**, 344–353.
- Aeschbach, D. and Borbely, A. 1992. All night dynamics of the human sleep. J. Sleep Res. 2, 70–81.
- Akerstedt, T. 1998. Is there an optimal sleepwake pattern in shift work?. Scandinavian Journal of Work Environment and Health 24(Suppl. 3), 18–27.
- Akerstedt, T. and Fröberg, J. 1977. Psychophysiological circadian rhythms in women during 72 hours of sleep deprivation. Waking and Sleeping 1, 387–394.
- Albers, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.: 1994. *Molecular biology of the cell*. 3 edn. Garland Publishing, Inc. New York, London.
- Albrecht, U., Sun, Z., Eichele, G. and Lee, C. 1997. A differential rsponse of two putative mammalian circadian regulators, mPer1 and mPer2, to light. *Cell* **91**, 1055–1064.
- Aldrich, J. 1990. Explanations of complex chronobiological data using triangles instead of sinusoids as proof that form is more important than theory. J. interdisc. Cycle Res. 21, 289–302.

Aldridge n.d.

Altenburger, R. and Matile, P. 1988. Circadian rhythmicity of fragrance emission in flowers of Hoya carnosa.. *Planta* 174, 248–252.

- Altenburger, R. and Matile, P. 1990. Further observations on rhythmic emission of. *Planta* 180, 194–197.
- Anderson, C. and Wilkins, M. 1989. Control of the circadian rhythm of carbon dioxide assimilation in Bryophyllum leaves by exposure to darkness and high carbon dioxide concentrations. *Planta* 177, 401–408.
- Anderson, D. and Keafer, B. 1987. An endogenous annual clock in the toxic marine dinoflagellate Gonyaulax polyedra. Nature 325, 616–617.
- Angers, A., Storozhuk, M., Duchaine, T., Castellucci, V. and DesGroseillers, L. 1998. Cloning and functional expression of an Aplysia 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. JOURNAL OF NEUROS-CIENCE 18, 5586–5593.
- Antkowiak, B.: 1987. Der Einfluss des pH auf die stationäre Glycolyse von Saccharomyces carlsbergensis.. Staatsexamensarbeit. University of Bonn.
- Antoch, M., Song, E., Hang, A., Vitaterna, M., Zhao, Y., Wilsbacher, L., Sangoram, A., King, D., Pinto, L. and Takahashi, J. 1997. Functional identification of the mouse circadian clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89, 655–667.
- Aoki, S., Kondo, T., Wada, H. and Ishiura, M. 1997. Circadian rhythm of the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803 in the dark. *Journal of Bacteriology* 179, 5751– 5755.
- Arechiga, H. and Wiersma, C. 1969. Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. J. Neurobiol. 1, 71–85.
- Arendt, H. 1997. Efficiacy of melatonin treatment in jetlag, shiftwork, and blindness. J. Biological Rhythms 12, 604.

- Arendt, J., Deveson, S., Folkard, S., Totterdell, P. and English, J. 1992. Use of melatonin in circadian rhythm disturbance associated with jet-lag and shift work. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research* 23, 156–158.
- Arnold, C. 1959. Die Blütenöffnung bei Oenothera in Abhängigkeit vom Licht-Dunkelrhythmus. *Planta* 53, 198–211.
- Aronson, B., Johnson, K. and Dunlap, J. 1994a. Circadian clock locus frequency: Protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 7683–7687.
- Aronson, B., Johnson, K., Liu, Q. and Dunlap, J. 1992. Molecular analysis of the Neurospora clock: Cloning and characterization of the frequency and period-4 genes. *Chronobiol. Internat.* 9, 231–239.
- Aronson, B., Johnson, K., Loros, J. and Dunlap, J. 1994b. Negative feedback defining a circadian clock: Autoregulation of the clock gene frequency. *Science* 263, 1578–1584.
- Arpaia, G., Loros, J., Dunlap, J., Morelli, G. and Macino, G. 1993. The interplay of light and the circadian clock: Independent dual regulation of clock-controlled gene ccg-2(eas). *Plant Physiology* **102**, 1299–1305.
- Asahira, T., Imanishis, H. and Tsukamoto, Y. 1968. Studies on the cormel formation in gladiolus. *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* 93, 21–34.
- Aschoff, J. 1955. Jahresperiodik der Fortpflanzung bei Warmblütern. Studium Generale 8, 742–776.
- Aschoff, J. 1966. Circadian activity patterns with two peaks. *Ecology* 47, 657–662.

- Aschoff, J.: 1981a. Annual rhythms in man. in J. Aschoff (ed.), Handbook of behavioral neurobiology. Vol. 4. Plenum Press, New York, London. pp. 475–487.
- Aschoff, J. 1981b. Biologische Uhren. Giessener Universitätsblätter 9, 9–20.
- Aschoff, J. and Wever, R.: 1981. The circadian system of man. *Handbook of behavioral neu*robiology. Vol. 4. Plenum Press, New York, London. pp. 311–332.
- Aschoff, J., Saint Paul, U. and Wever, R. 1971. Die Lebensdauer von Fliegen unter dem Einfluss von Zeitverschiebungen.. Naturwiss. 58, 574.
- Aserinsky, E. and Kleitman, N. 1953. Regularly occuring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 118, 273–274.
- Ashkenazi, I., Hartman, H., Strulovitz, B. and Dar, O. 1975. Activity rhythms of enzymes in human red blood cell suspension. J. interdiscipl. Cycle Res. 6, 291–301.
- Aukerman, M. and Amasino, R. 1996. Molecular genetic analysis of flowering time in Arabidopsis. Sem. Cell. Deve. Biol. 7, 427–433.
- Badot 1987. Potassium distribution in twining bean shoots.
- Bailey, L. 1892. Greenhouse notes for 1892-93.
  I. Third report upon electrohorticulture. N. Y. Agric. Exp. Stat. Bull. 55, 147.
- Baillaud, L.: 1962a. Les mouvements d'exploration et d'enroulement des plantes volubiles.. Handbuch der Pflanzenphysiologie. Vol. 17/2. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 637–715.
- Baillaud, L.: 1962b. Mouvements autonomes des tiges, vrilles et autres organes des organes volubiles et des feuilles. *Handbuch der*

*Pflanzenphysiologie.* Vol. 17/2. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 562–634.

- Baker, F. 1935. The effect of photoperiodism on resting treehole mosquito larvae. *Canad. Entom.* 67, 149.
- Baker, J. and Ranson, R. 1932. Factors affecting the breeding of the field mouse (Microtus agrestis). I. Light.. Proc.Roy.Soc., Series B 110, 113–332.
- Balzer, I. and Hardeland, R. 1989. Action of kynuramine in a dinoflagellate: Stimulation of bioluminescence in Gonyaulax polyedra.. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 94, 129–132.
- Balzer, I. and Hardeland, R. 1991. Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, Gonyaulax polyedra.. Science 253, 795–797.
- Balzer, I. and Hardeland, R. 1992. Effects of indoleamines and short photoperiods on the encystment of Gonyaulax polyedra.. *Chronobiol. Int.* 9, 260–265.
- Balzer, I. and Hardeland, R. 1996. Melatonin in algae and higher plants - possible new roles as a phytohormone and antioxidant. *Botani*ca Acta 109, 180–183.
- Balzer, I., Pöggeler, B. and Hardeland, R.: 1993. Circadian rhythms of indoleamines in a dinoflagellate, Gonyaulax polyedra: Persistence of melatonin rhythm in constant darkness and relationship to 5-methoxytryptamine. in Y. Touitou, F. Arendt and P. Pévet (eds), Melatonin and the pineal gland. From basic science to clinical application. Elsevier, Amsterdam. pp. 183–186.
- Bardal, T., Johnsson, A. and Chapman, D. 2001. Circumnutations of sunflower hypoco-

tyls in satellite orbis. A reappraisal of data from spacelab-1.

- Barlow, R. 1982. Seasonal changes in the modulation of sensitivity of the Limulus lateral eye. *Biol. Bull.* 163, 380.
- Barlow, R. 1983. Circadian rhythms in the Limulus visual system. J. Neurosciences 3, 856–870.
- Barlow, R., Bolanski, S. and Brachman, M. 1977. Efferent optic nerve fibers mediate circadian rhythms in the Limulus eye. *Science* 197, 86–89.
- Barlow, R., Chamberlain, S. and Levinson, J. 1980. Limulus brain modulates the structure and function of the lateral eyes. *Science* 210, 1037–1039.
- Barlow, R., Ireland, L. and Kass, L. 1982. Inhibition in the Limulus lateral eye. Nature 296, 65–66.
- Barnes, B. 1989. Freeze avoidance in a mammal: Body temperature below 0C in an arctic hibernator. Science 244, 1593–1595.
- Barnes, B., Kretzman, M., Licht, P. and Zucker, I. 1986. The influence of hibernation on testis growth and spermatogenesis in the golden mantled ground squirrel, Spermophilus lateralis. *Biol. Repsod.* 35, 1289–1297.
- Barnwell, F.: 1976. Variation in the form of the tide and some problems it poses for biological timing systems. in P. DeCoursey (ed.), Biological rhythms in the marine environment. University of South Carolina Press, Columbia. p. 161.187.
- Barrs, H. 1971. Cyclic variations in stomatal aperture, transpiration, and leaf water potential under constant environmental conditions. Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 223–236.

Basden, E. 1954. Diapause in Drosophila (Diptera: Drosophilidae). Proc. Royal Entomological Society of London 29, 114–118.

Baskin and Iino 1987.

- Batra, R. and Barlow, R. 1990. Efferent control of pattern vision in Limulus. Journal of General Physiology 95, 229–244.
- Batschauer, A. 1998. Photoreceptors of higher plants. *Planta* 206, 479–492.
- Batschelet, E.: 1965. Statistical methods for the analysis of problems in animal orientation and certain biological rhythms. AIBS monograph. American Institute of Biological Sciences.
- Battelle, Andrews, Calman, Sellers, Greenberg and Smith 1998a.
- Battelle, B.-A., Andrews, A, W., Calman, B., Sellers, J., Greenberg, R. and Smith, W. 1998b. A myosin III from Limulus eyes is a clock-regulated phosphoprotein. *Journal of Neuroscience* 18, 4548–4559.
- Batutis, E. and Ewing, E. 1982. Far-red reversal of red light effect during long-night induction of potato (Solanum tuberosum L.) tuberization. *Plant Physiol.* **69**, 672–674.
- Beau, J. 1992. Activity rhythms in mice: III. Stability and plasticity of rhythm characteristics in experimental and environmental conditions.. *Physiology and Behavior* 52, 231– 235.
- Beck, S.: 1963. Animal photoperiodism.. Holt, Rinehart and Winston, N.Y.
- Beck, S.: 1980. *Insect photoperiodism.* 2 edn. Ac.Press, NY, London etc.
- Becker, C. 1993. Environmental cues of estrus in the North American red squirrel (Tamiasciurus hudsonicus Bangs). *Canadian Journal* of Zoology **71**, 1326–1333.

- Beckman, A., Stanton, T. and Satinoff, E. 1976a. Characterization of midbrain components of the trigger for arousal from hibernation. Am. J. Physiol. 230, 368–375.
- Beckman, A., Stanton, T. and Satinoff, E. 1976b. Inhibition of the CNS trigger process for arousal from hibernation. Am. J. Physiol. 230, 1018–1025.
- Behrmann, G. and Hardeland, R. 1999. Bioluminescence and diurnal rhythmicity in dinoflagellates. *Institute of Scientific Film Göttingen*.
- Bell-Pedersen, D. 2000. Understanding circadian rhythmicity in Neurospora crassa: from behavior to genes and back again. *Fungal Genetics & Biology* 29, 1–18.
- Bell-Pedersen, D., Garceau, N. and Loros, J. 1996. Circadian rhythms in fungi. J. Genet. 75, 387–401.
- Bell-Pedersen, D., Lewis, Z., Loros, J. and Dunlap, J. 2001. The Neurospora circadian clock regulates a transcription factor that controls rhythmic expression of the output eas(ccg-2) gene. *Molecular Microbiology* **41**, 897–909.
- Bell-Pederson, D., Shinohara, M., Loros, J. and Dunlap, J. 1996. Circadian clock-controlled genes isolated from Neurospora crassa are late night- to early morning-specific.. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 13096– 13101.
- Belousov, B. 1958. Collection of abstracts of radiation medicine.. Sb.Ref. Radiats.Med.Medgiz p. 145.
- Belvin, M., Zhou, H. and Yin, J. 1999. The Drosophila dCREB2 gene affects the circadian clock. *Neuron* 22, 777–787.

- Benloucif, S., Masana, M. and Dubocovich, M. 1997. 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 Research 747, 34–42.
- Benson, J. and Jacklet, J. 1977a. Circadian rhythm of output from neurones in the eye of Aplysia. III. Effects of light on clock and receptor output measured in the optic nerve. *JEBiol* **70**, 183–194.
- Benson, J. and Jacklet, J. 1977b. Circadian rhythm of output from neurones in the eye of Aplysia. IV. A model of the clock: Differential sensitivity to light and low temperature pulses. J Experimental Biology 70, 195–211.
- Benson, J. and Jacklet, J. 1977c. Circadian rhythm of output from neurones in the eye of Aplysia. IV. A model of the clock: Differential sensitivity to light and low temperature pulses. *JEBiol* **70**, 195–211.
- Beppu, K., Yoshida., T. and Kimura, M. 1996. Seasonal life cycles and adaptations of four species of Drosophila at high altitudes in Central Japan. Japanese Journal of Entomology 64, 627–635.
- Berger, R. 1988. Comparative aspects of energy metabolism, body temperature and sleep. Acta Physiol. Scand. 133 Suppl. 574, 21– 27.
- Berger, R. 1993. Cooling down to hibernate: Sleep and hibernation constitute a physiological continuum of energy conservation. *Neurosc. Lett.* **154**, 213–216.
- Berger, S., Dirk, J., Lindern, L., Wolff, D. and Mergenhagen, D. 1992. Temperature dependency of circadian period in a single cell (Acetabularia). *Bot. Acta* 105, 382–386.

- Bernal-Moreno, Miranda-Anaya and Fanjul-Moles 1996. These phase shiftings lead to phase response curves which are normally obtained by dark pulses in other species with advances in the early subjective night and delays in late subjective night.
- Berner, N., Grahn, D. and Heller, H. 1999. 8-OH-DPAT-sensitive neurons in the nucleus raphe magnus modulate thermoregulatory output in rats. Brain-Res. 831, 155–164.
- Bernier, G.: 1969. Sinapis alba L.. in L. Evans (ed.), *The induction of flowering*. Macmillan of Australia. pp. 305–327.
- Bernier, G. 1971. Structural and metabolic changes in the shoot apex in transition to flowering.. Can. J. Bot. 49, 803–819.
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. and Lejeune, P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5, 1147–1155.
- Berthold, P. 1973. Relationship between migratory restlessness and migration distance in six Sylvia species. *Ibis* 155, 594–599.
- Berthold, P. 1978. Circannuale Rhythmik: freilaufende selbsterregte Periodik mit lebenslanger Wirksamkeit bei Vögeln.. Naturwiss. 65, 546.
- Berthold, P.: 2001. Bird migration. A general survey. 2nd edn. Oxford University Press.
- Berthold, P. and Querner, U. 1982. Genetic basis of molt, wing length, and body weight in a migratory bird soecies, Sylvia atricapilla. *Experientia* 38, 801–802.
- Berthold, P., Gwinner, E. and Klein, H. 1972. Circannuale Periodik bei Grasmücken. I. Periodik des Körpergewichts, der Mauser und der Nachtunruhe bei Sylvia atricapilla und S. borin unter verschiedenen konstanten Bedingungen.. J. Ornithol. 113, 170–190.

- Betz, A. and Chance, B. 1965. Arch. Biochem. Biophys 109, 579-xx.
- Bissonette, T. 1932. Modification of mammalian sexual cycles. I. Reactions of ferrets (Putoris vulgaris) of both sexes to electric light added after dark in November and December. *Proc. Roy. Soc.*, *Series B* 110, 332–336.

Bjerner and Swensson 1953.

- Black, M. and Wareing, P. 1955. Growth studies in woody species. VII. Photoperiodic control of germination in Betula pubescence Ehsh.. *Physiol. Plant.* 8, 300–316.
- Blake, G. 1959. Control of diapause by an 'internal clock' in Anthrenus verbasci (L.) (Col. Dermestidae). *Nature* **183**, 126–127.
- Blank 1992. PP Peromyscus not all animals of a population react photoperiodically.
- Blaschke, I., Lang, P., Hofbauer, A., Engelmann, W. and Helfrich-Förster, C.: 1996. Preliminary action spectra suggest that the clock cells of Drosophila are synchronized to the external LD-cycle by the compound eyes plus extraretinal photoreceptors. in N. Elsner and H. Schnitzler (eds), Brain and Evolution. Proceedings of the 24th Göttingen Neurobiology Conference. Thieme Stuttgart New York. p. 30.
- Blasius, B., Neff, R., Beck, F. and Lüttge, U. 1997. A model for photosynthetic oscillations in crassulacean acid metabolism. *JTB* 184, 345–351.
- Blasius, B., Neff, R., Beck, F. and Lüttge, U. 1999. Oscillatory model of crassulacean acid metabolism with a dynamic hysteresis switch. Proc. R. Soc. London 266, 93–101.
- Bleuler 1911. Schizophrenia is the most common mental disease.

- Bligh, J.: 1973. Temperature regulation in mammals and other vertebrates.. North-Holland Publ., Amsterdam.
- Block, G. 1996. Studying the snail's clock at better than a snail's pace. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 29, 71– 75.
- Block, G. and McMahon, D. 1983. Localized illumination of the Aplysia and Bulla eye reveals new relationships between retinal layers. *Brain Res.* 265, 134–137.
- Block, G. and McMahon, D. 1984. Cellular analysis of the Bulla ocular circadian pacemaker system: III. Localization of the circadian pacemaker. *Journal of Comparative Physio*logy A 155, 387–396.
- Block, G., Geusz, M., Khalsa, S., Manivannan, K., Michel, S. and Whitmore, D. 1994. Unwinding the snail's clock: Cellular analysis of a retinal circadian pacemaker. *Netherlands* J. Zoology 44, 550–562.
- Block, G., Guesz, M., Khalsa, S., Michel, S. and Whitmore, D. 1996. Circadian rhythm generation, expression and entrainment in a molluscan model system. *Progress in Brain Research* 111, 93–102.
- Block, G., Khalsa, S., McMahon, D., Michel, S. and Guesz, M. 1993. Biological clocks in the retina: cellular mechanisms of biological timekeeping. *International Review of Cytology* 146, 83–144.
- Boer, F. n.d.. Lindauer Bilderbogen Nr. 5. Jan Thorbeck Verlag, Sigmaringen.
- Bogumil, R., Ferin, M. and Wiele, R. 1972. Mathematical studies of the human menstrual cycle. II. Simulation performance of a model of the human menstrual cycle. J. Clinical Endocrinology and Metabolism 35, 144–156.

- Bollig, I. 1975. Photoperiodic time measurement and circadian leaf movement in Pharbitis nil controlled by the same clock?. Z. Pflanzenphysiol. 77, 54-69.
- Bollig, I., Chandrashekaran, M., Engelmann, W. and Johnsson, A. 1976. Photoperiodism in Chenopodium rubrum - an explicit version of the Bünning hypothesis.. Int. J. Chronobiol. 4, 83-96.
- Borbely, A. 1982. A two process model of sleep regulation.. *Hum. Neurobiol.* **1**, 195–204.
- Borbely, A. 1997. Whether it is safe to apply melatonin externally is discussed .commentary. *JBR*.
- Borbely, A. and Wirz-Justice, A. 1982. Sleep, sleep deprivation and depression.. Hum. Neurobiol. 1, 205–210.
- Borbely, A., Tobler, I., Achermann, P. and Geering, B. 1999. Bits of sleep. Explore the facts behind the mystery. http://www.unizh/phar/sleepcd. US\$99.-.
- Borgeson and X 1985. Neurospora cytochrome in the plasmalemma could be responsible for the influence of light on the rhythm.
- Borghi and et al. 1986. The effects of blue and red light on Acetabularia mediterranea after a long dark period: recovery of the endogenous rhythms of transcellular electrical potential and chloroplast velocity.. Can.J. Bot. 64, 1134–1137.
- Bornkamm 1966. Ein Jahresrhythmus des Wachstums bei Lemna minor L.. *Planta* **69**, 178–186.
- Borthwick, H., Hendricks, S., Toole, E. and Toole, V. 1954. Action of light on lettuce seed germination. *Botanical Gazette* **115**, 205– 225.

- Boulant, J. 1981. Hypothalamic mechanisms in thermoregulation. *Fed. Proc.* **40**, 2843–2850.
- Boulos, Z. and Rusak, B.: 1982. Phase-response curves and the dual-oscillator model of circadian pacemakers. *in* J. Aschoff, S. Daan and G. Groos (eds), *Vertebrate circadian systems*. Springer Berlin. pp. 215–223.
- Bounhiol, J.-J. and Moulinier, C. 1965. L'opacité cranienne et ses modifications naturelles et experimentelles chez le ver à soie. C. R. Acad. Sci. 261, 2739–2741.
- Bowler, C. 1994. Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev.* 8, 2188– 2202.
- Boyer, B. and Barnes, B. 1999. Molecular and metabolic aspects of mammalian hibernation.. *Biosc.* 49, 713–724.
- Bradbury MJ, Dement WC, E. 1997. Serotonin-containing fibers in the suprachiasmatic hypothalamus attenuate light-induced phase delays in mice. *Brain Research* **768**, 125–134.
- Bradley, R. and Reddy, K. 1997. Cloning, sequencing, and regulation of the global nitrogen regulator gene ntcA in the unicellular diazotrophic cyanobacterium Cyanothece sp. strain BH68K. *Journal of Bacteriology* **179**, 4407–4410.
- Bradshaw, W. 1969. Major environmental factors inducing the termination of larval diapause in Chaoborus americanus Johannsen (Diptera: Culicidae). *Biol. Bull.* **139**, 2–8.
- Bradshaw, W. 1970. Interaction of food and photoperiod in the termination of larval diapause in Chaoborus americanus (Diptera: Culicidae). *Biol. Bull.* **139**, 476–484.

- Bradshaw, W. 1972. Photoperiodic control in the initiation of diapause by Chaoborus americanus. Ann. Entomol. Soc. Amer. 65, 755– 756.
- Bradshaw, W. and Lounibos, L. 1972. Photoperiodic control of development in the pitcherplant mosquito, Wyeomyia smithii. *Can. J. Zool.* 50, 713–719.
- Brady, J.: 1982. Biological timekeeping.. Soc. Exp. Biol seminar series 14. Cambridge Univ. Press.
- Brain, R., Freeberg, J., Weiss, C. and Briggs, W. 1977. Plant Physiol. 59, 948–.
- Brainard, G., X and X 1997. Photic regulationof melatonin in humans: ocular and neural signal transduction. J. Biol. Rhythms 12, 537–546.
- Brantjes, N.: 1973. Sphingophilous flowers, function of their scent. in N. Brantjes (ed.), *Pollination and dispersal*. Nijmegen, Department of Botany. pp. 27–46.
- Brantjes, N.: 1978. Sensory responses to flowers in night flying moths. in A. Richards (ed.), *The pollination of flowers by insects*. Academic Press, London. pp. 13–19.
- Braun, A., Balkin, T., Wesensten, N., Gwadry, F., Casson, R., Varga, M., Baldwin, P., Belanky, G. and Herscovitch, P. 1998. Dissociated pattern of activity in visual cortices and their projection during human rapid eye movement sleep. *Science* 279, 91–95.
- Brinkmann, K.: 1973. Respiration dependent types of temperature compensation in the circadian rhythm of Euglena gracilis. *in*B. Chance (ed.), *Biological and biochemical* oscillators. pp. 513–521.
- Britz, S. and Briggs, W. 1976. Circadian rhythms of chloroplast orientation and pho-

tosynthetic capacity in Ulva. *Plant Physiol.* **58**, 22–27.

- Broda, H.: 1979. in Bonotto (ed.), Developmental Biology of Acetabularia.
- Broda, H. and Schweiger, H. 1981. Long-term measurement of endogenous diurnal oscillations of the electrical potential in an individual Acetabularia cell.. *Eur. J. Cell Biol.* 26, 1–4.
- Broda, H., Brugge, D., Homma, K. and Hastings, J. 1985. Circadian communication between unicells? Effects on period by cellconditioning of medium. *Cell Biophysics* 8, 47–67.
- Broda, H., Gooch, D., Taylor, W. and Aiuto, N. 1986. Acquisition of circadian bioluminescence data in Gonyaulax and an effect of the measurement procedure on the period of the rhythm.. Journal of Biol. Rhythms 1, 251– 263.
- Brody, S. 1992. Circadian rhythms in Neurospora crassa: The role of mitochondria. *Chro*nobiol. Intern. 9, 222–230.
- Brody, S. and Martins, S. 1979a. Circadian rhythm in Neurospora crassa: Effects of saturated fatty acids. J. Bacteriol. 139, 977–983.
- Brody, S. and Martins, S. 1979b. Circadian rhythm in Neurospora crassa: Effects of unsaturated fatty acids. J. Bacteriol. 137, 912– 915.
- Brogardh, T. and Johnsson, A. 1974a. Effects of lithium on stomatal regulation. Z. Naturforsch. 29c, 298–300.
- Brogardh, T. and Johnsson, A. 1974b. Oscillatory transpiration and water uptake of Avena plants. III. Action of heavy water on the oscillations.. *Physiol. Plant.* **31**, 112–118.

- Brogardh, T. and Johnsson, A. 1975a. Effects of magnesium, calcium and lanthanum ions on stomatal oscillations in Avena sativa L.. *Planta* **124**, 99–103.
- Brogardh, T. and Johnsson, A. 1975b. Regulation of transpiration in Avena. Responses to white light steps. *Physiol. Plantarum* 35, 115–125.
- Brown, A. 1993. Circumnutations: from Darwin to space flights.. *Plant Physiol* 101, 345– 348.
- Brown, E., Choe, Y., Shanaham, T. and Czeisler, C. 1997. A mathematical model of diurnal variations in human plasma melatonin levels. *AJP* 272, E506–516.
- Bruce, V. 1970. The biological clock in Chlamydomonas reinhardi. J. Protozool. 17, 328– 334.
- Bruce, V. 1972. Mutants of the biological clock in Chlamydomonas reinhardti. *Gene*tics 70, 537–548.
- Bruce, V. 1974. Recombinants between clock mutants of Chlamydomonas reinhardtii. *Genetics* 77, 221–230.
- Bruce, V. and Bruce, N. 1978. Diploids of clock mutants of Chlamydomonas reinhardtii. *Genetics* 77, 221–230.
- Bruce, V. and Pittendrigh, C. 1956. Temperature independence in a unicellular 'clock'. *Proc. National Acad. Science US.*
- Brun, R.: 1914. Die Raumorientierung der Ameisen. Gustav Fischer.
- Bryant, T. 1972. Gas exchange in dry seeds: Circadian rhythmicity in the absence of DNA replication, transcription, and translation. *Science* **178**, 634–636.

- Bult, A., Hiestand, L., van der Zee, E. and Lynch, C. 1993. Circadian rhythms differ between selected mouse lines: A model to study the role of vasopressin neurons in the suprachiasmatic nuclei. **32**, 623–627.
- Bunney, W. and Bunney, B. 2000. Molecular clock genes in man and lower animals: Possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology* 22, 335–345.
- Bünning, E. 1932. Über die Erblichkeit der Tagesperiodizität bei den Phaseolus-Blättern. *Jb. wiss. Botanik* 77, 283–.
- Bünning, E. 1936. Die endogene Tagerhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 54, 590–607.
- Bünning, E. 1949. Zur Physiologie der endogenen Jahresrhythmik in Pflanzen, speziell in Samen.. Zeitschr. Naturf. 4b, 167–176.
- Bünning, E. 1951. Erbliche Jahresrhythmen bei Pflanzen. Umschau 51, 268–270.
- Bünning, E. 1967. The physiological clock. *Springer New York.*
- Bünning, E.: 1983. The physiological clock. Vol. 1 of Heidelberg Science Library. 2 edn. Springer New York.
- Bünning, E. 1986. Evolution der circadianen Rhythmik und ihrer Nutzung zur Tageslängenmessung. Naturwiss. 73, 70–77.
- Bünning, E. and Moser, I. 1969. Interference of moon light with the photoperiodic measurement of time by plants, and their adaptive rection. *Proc.Nat.Acad.Science (USA)* 62, 1018–1022.
- Burla, H. 1951. Systematik, Verbreitung und Ökologie der Drosophila-Arten der Schweiz. *Rev. Suisse Zool.* 58, 23–157.

- Butler, W., Norris, K., Siegelman, H. and Hendricks, S. 1959. Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 45, 1703–.
- Byrne and X 1992. phototaxis and chemotaxis in Chlamydomonas.
- C and et al. 1990.
- C and X 1997. missing, check.
- Cabanac, M. 1975. Temperature regulation.. Am. Rev. Physiol. 37, 415–439.
- Cagnacci, A., Kräuchi, K., Wirz-Justice, A. and Volpe, A. 1997. Homeostatic versus circadian effects of melatonin on core body temperature in humans. *Jornal of Biological Rhythms* 12, 509–517.

Cajochen and X 1997.

- Calman, B. and Chamberlain, S. 1982. Distinct lobes of Limulus ventral photoreceptors. II. Structure and ultrastructure. J. Gen. Physiol. 80, 839–862.
- Calman, B. and Chamberlain, S. 1992. Localization of actin filaments and microtubules in the cells of the Limulus lateral and ventral eyes. *Visual Neuroscience* 9, 365–375.
- Calman, B., Lauerman, M., Andrews, A., Schmidt, M. and Battelle, B. 1991. Central projections of Limulus photoreceptor cells revealed by a photoreceptor-specific monoclonal antibody. *Journal of Comparative Neu*rology **313**, 553–562.
- Campbell and Tobler, I. 1984. Animal sleep: A review of sleep duration across phylogeny. *Neurosc. and Biobeh. Rev.* 8, 269–300.
- Campbell, S. and Murphy, P. 1998. Extraocular circadian phototransduction in humans. *Science* 279, 396–399.

- Carey, C., Florant, G., Wunder, B. and Horwitz, B.: 1993. Life in the cold: Ecological, physiological and molecular mechanisms. Westview Press, Boulder.
- Carpenter, G. and Grossberg, S. 1983. A neural theory of circadian rhythms: The gated pacemaker. *Biol Cyb.* 48, 35–50.

Carpenter, G. and X 1993.

- Carpenter, G. and X n.d., is CX93, check.
- Carr, D. 1952. A critical experiment on Bünning's theory of photoperiodism. Zeitschr. Naturf. 76, 570–.
- Carré, I.: 1998. Genetic dissection of the photoperiod-sensing mechanism in the long.day plant Arabidopsis thaliana. *Biological rhythms and photoperiodism in plants*. Environmental Plant Biology. Bios Scientific Publishers Oxford, Washington DC. pp. 257–269.
- Carskadon, M. and Dement, S. 1987. bimodal sleep xx.
- Carson, H. and Stalker, H. 1948. Reproductive diapause in Drosophila robusta. *PNAS* 34, 124–129.

Carter, P. and et al. 1996.

- Carter, P., Nimmo, H., Fewson, C. and Wilkins, M. 1991. Circadian rhythms in the activity of a plant protein kinase. *EMBO J.* **10**, 2063– 2068.
- Casal, J., Sanchez, R. and Botto, J. 1998. Modes of action of phytochromes. *Journal of Ex*perimental Botany 49, 127–138.
- Casal, J., Sanchez, R. and Yanovsky, M. 1997. The function of phytochrome A. *Plant Cell* and *Environment* 20, 813–819.

- Cashmore, A., Jarillo, J., Wu, Y. and Liu, D. 1999. Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760– 765.
- Caspar, T. and Pickard, B. 1989. Gravitropism in a starchless mutant of Arabidopsis. Implications for the starch-statolith theory. *Planta* 177, 185–197.
- Caspers 1951. Rhythmische Erscheinungen in der Fortpflanzung von Clunio marinus (Dipt., Chironomidae) und das Problem der lunaren Periodizität bei Organismen. Arch. Hydrobiologie 18 Suppl., 415–599.
- Caspers, H. 1984. Spawning periodicity and habitat of the palolo worm Eunice viridis in the Samoan islands. *Marine Biology* 79, 229– 236.
- Cassone, V. 1993. Melatonin in vertebrate circadian rhythm. Chronobiology International 15, 457–473.
- Cassone, V. and Natesan, A. 1997. Time and time again: The phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *Journal of Biological Rhythms* 12, 489–497.
- Cassone, V., Warren, W., Brooks, D. and Lu, J. 1993. Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *Journal of Biological Rhythms* 8, S73–S81.
- Ceriani, M., Darlington, T., Staknis, D., Mas, P., Petti, A., Weitz, C. and Kay, S. 1999. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. Science 285, 553–568.
- Chailakhyan, M. 1936a. New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Dokl. Acad. Sci. USSR* 13, 79–83.
- Chailakhyan, M. 1936b. On the hormonal theory of plant development. C. R. Dokl. Acad. Sci. URSS **3**, 442.

- Chailakhyan, M. 1937. Concerning the hormonal nature of plant development processes. C. R. Dokl. Acad. Sci. URSS 16, 227.
- Chailakhyan, M. 1968. Internal factors of plant flowering. Ann. Rev. Plant Physiol. 19, 1–36.
- Chailakhyan, M. 1970. Flowering and photoperiodism of plants. *Plant Science Bulletin* 16, 1–7.
- Chailakhyan, M., Yanina, L., Devedzhyan, A. and Lotova, G. 1981. Photoperiodism and tuber formation in grafting of tobacco onto potato. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 257, 1276– 1280.
- Chamberlain, S. 1998. Circadian rhythms in the horseshoe crab lateral eye: Signal transduction and photostasis. *Bioelectrochemistry* & *Bioenergetics* 45, 111–121.
- Chamberlain, S. and Barlow, R. 1977. Morphological correlates of efferent circadian activity and light adaptation in the Limulus lateral eye. *Biol. Bull.* **153**, 418–419.
- Chamberlain, S. and Barlow, R. 1979. Light and efferent activity control rhabdom turnover in Limulus photoreceptors. *Science* **206**, 361–363.
- Chamberlain, S. and Barlow, R. 1980. Neuroanatomy of the visual afferents in the horseshoe crab (Limulus polyphemus). J. comp. Neurol. 192, 387–400.
- Chance, B., Pye, K. and Higgins, J. 1967. Waveform generation by enzymatic oscillators.. *IEEE Spectrum* 4, 79–86.
- Chandrashekaran, M. and Engelmann, W. 1976. Amplitude attenuation of the circadian rhythm in Drosophila with light pulses of varying irradiance and duration. *Int. J. Chronobiol.* **4**, 231 – 240.

- Chang, B. and Nakashima, H. 1998. Isolation of temperature sensitive rhythm mutant in Neurospora crassa. *Genes Gen. Syst.* 73, 71– 73.
- Chen, T., Chen, T., Hung, L. and Huang, T. 1991. Circadian rhythm in amino acid uptake by Synechococcus RF-1. *Plant Physiology* 97, 55–59.
- Chen, Y., Hunter-Ensor, M., Schotland, P. and Seghal, A. 1998. Alterations of per RNA in noncoding regions affect periodicity of circadian behavioral rhythms. *J. Biol. Rhythms* 13, 364–379.
- Chen, Y., Zehr, J. and Mellon, M. 1996. Growth and nitrogen fixation of the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium Trichodesmium sp. IMS 101 in defined media: Evidence for a circadian rhythm. *Journal of Phycology* **32**, 916–923.
- Cheng, Y. and Hardin, P. 1998. Drosophila photoreceptors contain an autonomous circadian oscillator that can function without period mRNA cycling. J. Neurosci. 18, 741– 750.
- Cholodny, N. 1926. Beiträge zur Analyse der geotropischen Reaktion. Jahrbuch Wiss. Bot. 65, 447–459.
- Clauser, C.: 1954. Die Kopfuhr. Stuttgart.
- Clough 1997. Phytochrome A and its mRNA are inactivated and metabolized quickly by light.
- Colasanti, J. and Sundaresan, V. 2000. 'Florigen' enters the molecular age: long-distance signals that cause plants to flower. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 236–240.
- Colepicolo, P., Camarero, V. and Hastings, J. 1992. A circadian rhythm in the activity

of superoxide dismutase in the photosynthetic alga Gonyaulax polyedra.. *Chron. Int.* **9**, 266–268.

- Colepicolo, P., Roenneberg, T., Morse, D., Taylor, W. and Hastings, J. 1993. Circadian regulation of bioluminescence in the dinoflagellate Pyrocystis lunula. J. of Phycol. 29, 173– 179.
- Collett, M., Dunlap, J. and Loros, J. 2001. Rhythms defects in the clock-affecting strain cla-1 are due to a re-isolation of the frq7 allele. *Fungal Genetics Newslet*.
- Colquhoun, W.: 1981. Rhythms in performance. in J. Aschoff (ed.), Handbook of behavioral neurobiology. Vol. 4. Plenum Press, New York, London. pp. 333–350.
- Colwell, C. 1990. Light and serotonin interact in affecting the circadian system of Aplysia. Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology 167, 841–846.
- Colwell, C., Khalsa, S. and Block, G. 1992. Cellular mechanisms of entrainment. *Chronobi*ol. Intern. 9, 163–179.
- Comoli, J., Taylor, W. and Hastings, J. 1994. An inhibitor of protein phosphorylation stops the circadian oscillator and blocks light-induced phase shifting in Gonyaulax polyedra.. Journal of Biological Rhythms 9, 13–26.

Conti and X 1996.

- Cooper and X 1993. Spalax ehrenbergi The SCN is, however, well developed and contains projections of the rudiments of the retina.
- Corbet, P. and et al. 1974. J. Zool. London 172, 491–502.

- Corrent, G. and Eskin, A. 1982. Transmitterlike action of serotonin in phase shifting a rhythm from the Aplysia eye. Am. J. Physiol. 242, R333–338.
- Corrent, G., Eskin, A. and Kay, I. 1982. Entrainment of the circadian rhythm from the eye of Aplysia: role of serotonin. Am. J. Physiol. 242, R326–R332.
- Corrent, G., McAdoo, D. and Eskin, A. 1979. Serotonin shifts the phase of the circadian rhythm from the Aplysia eye. *Science* 202, 977–979.
- Cosgrove, D. 1993. Wall extensibility: Its nature, measurement, and relationship to cell growth. *New Phytol.* **124**, 1–23.
- Cosgrove, D. 1996. Multinet cell wall model.
- Cosgrove, D. 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. Ann. Rev. Cell. Devel. Biol. 13, 171–201.

Cossins 1987.

- Cote, G. and Brody, S. 1987. Circadian rhythms in Neurospora: Membrane composition of a mutant defective in temperature compensation. *Biochim. Biophys. Acta* 898, 23–xx.
- Cote, G. and X. 1997.
- Cottignies, A. 1993. Dormancy and likedormancy in ash-trees deprived of seasonal variations. *Acta Botanica Gallica* **140**, 231– 241.
- Coupland, G.: 1998. Photoperiodic regulation of flowering time in Arabidopsis. in P. Lumsden and A. Millar (eds), Biological rhythms and photoperiodism in plants. Environmental plant biology. Bios Scientific Oxford. pp. 243–255.

- Crick and Mitchison 1984. speculate on the function of the REM sleep. According to them dreaming during REM sleep is a way of an active de-learning. SD 4846.
- Crosthwaite, S., Dunlap, J. and Loros, J. 1997. Neurospora wc-1 and wc-2: Transciption, photoresponses, and the origin of the circadian rhythmicity. *Science* 276, 763–769.
- Crosthwaite, S., Loros, J. and Dunlap, J. 1995. Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. *Cell* **81**, 1003–1012.
- Cumming, B.: 1967. Early flowering plants. in F. Wilt and N. Wessells (eds), Methods in developmental biology. Thomas Y. Crowell, New York. pp. 277–299.
- Curry, K. 1998. Young dinos grew up fast. Science 282, 603–604.
- Curtis, O. and Chang, H. 1930. The relative effectiveness of the temperature of the crown as contrasted with that of the plant upon the flowering of celery plants. *Am. J. Botany* **17**, 1074.
- Cushman: 1996. xx. in K. Winter and J. Smith (eds), Crassulacean acid metabolim. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Springer Berlin, Heidelberg, New York etc.
- Cymborowski, B.: 1992. *Insect endocrinology*. Elsevier Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.
- Czeisler, C. and Dijk, D. 1995. Use of bright light to treat maladaptation to night shift work and circadian rhythm sleep disorders. *Journal of Sleep Research* **4** (Suppl. 2), 70– 73.
- Czeisler, C. and Turek, F.: 1997. Special issue: Melatonin, sleep and circadian rhythms. Current progress and controversies. Vol. 12. pp. 509–xx.

D, A and vdH 2001.

- Daan, S. 1973. Activity during natural hibernation in three species of vespertilionid bats. *Neth. J. Zool.* 23, 1–71.
- Daan, S. n.d.. Strong time cues are the lightdark-cycle ref missing.
- Daan, S. and Beersma, D.: 1984. Circadian gating of human sleep-wake cycles. in M. Moore-Ede and C. Czeisler (eds), Mathematical models of the circadian sleep-wake cycle. Raven Press, New York.
- Daan, S., Beersma, D. and Borbely, A. 1984. Timing of human sleep: Recovery process gated by a circadian pacemaker. *AJP* 246, R161–178.
- Dalgleish, T., Rosen, K. and Marks, M. 1996. Rhythm and blues: The theory and treatment of seasonal affective disorder. *British Journal of Clinical Psychology* 35, 163–182.
- Danilevskii, A.: 1965. *Photoperiodism and sea*sonal development of insects. first english edition edn. Oliver and Boyd, Edinburgh and London.
- Danks, H.: 1987. Insect dormancy: An ecological perspective.. Biological Survey of Canada, Ottawa.
- Darlington, T., Wagner-Smith, K., Ceriani, M., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T., Weitz, C., Takahashi, J. and Kay, S. 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science* 280, 1599–1603.
- Darwin, C. and Darwin, F.: 1880. *The power of* movement in plants. John Murray London.
- Dasilva, R. and Minomo, F. 1995. Circadian and seasonal variation of the body temperature of sheep in a tropical environ-

ment. International Journal of Biometeorology **39**, 69–73.

Daussmann, K., Ganzhorn, J. and Heldmaier, G.: 2000. Body temperature and metabolic rate of a hibernating primate in Madagascar: Preliminary results from a field study.. in G. Heldmaier and M. Klingenspor (eds), Life in the cold. Springer Berlin, Heidelberg, New York etc.. pp. 41–47.

Davis 1973. Symp. Soc. Exp. Biol. 27, 513.

- Davis, D. and Finnie, E. 1975. Entrainment of circannual rhythm in weight of woodchucks. J. Mammal. 56, 199–203.
- Davis, F.: 1981. Ontogeny of circadian rhythms. *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. 4. Plenum Press, New York, London. pp. 257–274.
- Davis, F. 1997. Melatonin: Role in development. J. Biological Rhythms 12, 498–508.

Dawe n.d.. Hibernation hypothesish.

De Gorter 1736.

- Dealberto 1992. sleep disturbances schizophrenia xx.
- Deboer, T. and Tobler, I.: 2000a. The Djungarian hamster is sleep deprived during daily torpor. in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), Life in the cold. Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 251–260.
- Deboer, T. and Tobler, I. 2000b. Slow waves in the sleep electroencephalogram after daily torpor are homeostatically regulated. *Neuroreport*.
- DeCoursey, P.: 1976. Biological Rhythms in the marine Environment. number 4 in The Belle W. Baruch library for marine biology and coastal research. University of South Carolina Press, Columbia South Carolina.

- Degn, H. 1972. Oscillating chemical reactions in homogenous phase. J. Chemical Education 49, 302–306.
- Delmer, D. and Brody, S. 1975. Circadian rhythms in Neurospora crassa: Oscillation in the level of an adenine nucleotide. J. Bacteriology 121, 548–553.
- Demas, G., Devries, A. and Nelson, R. 1997. Effects of photoperiod and 2-deoxy-Dglucose-induced metabolic stress on immune function in female deer mice. *American Jour*nal of Physiology **272**, R1762–R1767.
- Demas, G., Klein, S. and Nelson, R. 1996. Reproductive and immune responses to photoperiod and melatonin are linked in Peromyscus subspecies. Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology 179, 819–825.
- Dembinska, M., Stanewsky, R., Hall, J. and Rosbash, M. 1997. Circadian cycling of a PERIOD-beta-galactosidase fusion protein in Drosophila:evidence for cyclical degradation.. J. Biol. Rhythms 12, 157–172.
- Dement, W. and Kleitman, N. 1957. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming.. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 9, 673–690.
- Denault, D., Loros, J. and Dunlap, J. 2001. WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of Neurospora. *EMBO JOURNAL* 20, 109–117.
- Denffer, D. 1950. Blühhormon oder Blühhemmung? Neue Gesichtspunkte zur Physiologie der Blütenbildung. Naturwiss. 37, 296–.
- Denlinger, D. 1972. Induction and termination of pupal diapause in Sarcophaga (Diptera: Sarcophagidae). *Biol.Bull.* 142, 11–24.

- Deutsch, A. 1993. Das Experiment: Sporenmusterbildung beim Schlauchpilz Neurospora crassa. *Biologie in unserer Zeit* 23, 259– 264.
- Deutsch, A., Dress, A. and Rensing, L. 1993. Formation of morphological differentiation patterns in the ascomycete Neurospora crassa. *Mechanisms of Development* 44, 17–31.
- Deutsch, B. and Deutsch, B. 1974. A kinetic theory of first order cyclic processes; phytochrome controlled red light induces cereal leaf unfolding compared with theory. *Physi*ol. Plant. **32**, 273–281.
- Dewan, E.: 1977. Regulation of primat cycles by photic stimulation. Data Sciences Laboratory, Air Force Cambridge Research Laboratories, Bedford, Mass.
- Dewan, E., Menkin, M. and Rock, J. 1978. Effect of photic stimulation on the human menstrual cycle. *Photochemistry and Photobiology* 27, 581–585.
- Dewey, E. and Dakin, E.: 1947. *Cycles. The science of prediction.*. Henry Hold & Co, New York.
- DeWilde 1958. Perception of the photoperiod by the Colorado potato beetle (Leptinotarsa decemlineata Say). Proc. tenth Int. Congr. Entom. 2, 213–218.
- Dharmananda, S.: 1980. Studies on the circadian clock of Neurospora crassa: Light-induced phase shifting.. PhD thesis. University of California, Santa Cruz.
- Dickson, L. and Waaland, J. 1985. Porphyra nereocystis: A dual-daylength seaweed. *Planta*.
- Dieckman, C. and Brody, S. 1980. Circadian rhythm in Neurospora crassa: Oligomycin resistant mutations affect periodicity. *Science* 207, 896–898.

- Diez-Noguera, A. 1994. A functional model of the circadian system based on the degree of intercommunication in a complex system. *AJP* 36, R1118–1135.
- Diez-Noguera, A. 2000. El Temps. Analysis tool for chronobiology. *CD*.
- Dijk, D.-J. and X 1997. It may have a modest direct hypnotic effect, but could also correct circadian phase abnormalities. In this case it might interact with melatonin receptors in the suprachiasmatic nucleus (SCN). As a result the circadian pacemaker could be reset and/or SCN-dependent circadian alerting processes could be attenuated. For details see.
- Dobat, K.: 1985. Blüten und Fledermäuse. Bestäubung durch Fledermäuse und Flughunde (Chiropterophilie). Senckenberg Naturforschende Gesellschaft Frankfurt, Senckenberg Buch 60. W. Kramer, Frankfurt.
- Doggett, V. and Keilers, R. 1962. Anat. Rec. 142, 227.
- Dorka, R.: 1991. Die Wirkung von Tetraethylammoniumchlorid (TEA) auf die circadiane Blütenblattbewegung von Kalanchoe blossfeldiana (v. Poeln.). Diplomarbeit. Universität Tübingen.
- Dorn, M. and Weber, D.: 1988. *Die Luzerne-Blattschneiderbiene*. Neue Brehm-Bücherei, Ziemsen Verlag Wittenberg.
- Dowse, H. and Ringo, J. 1989. The search for hidden periodicities in biological time series revisited. J. theor. Biology 139, 487–515.
- Dowse, H. and Ringo, J.: 1992. Do ultradian rhythms underlie the circadian clock in Drosophila?. Ultradian rhythms in life processes. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 105–117.

- Dowse, H. and Ringo, J. 1994. Summing locomotor activity data into 'bins': How to avoid artifact in spectral analysis. *Biol. Rhyth Re*search 25, 2–14.
- Drew, E. and Abel, K. 1992. Studies on Halimeda: IV. An endogenous rhythm of chloroplast migration in the siphonous green alga, Halimeda distorta. *Journal of Interdiscipli*nary Cycle Research 23, 128–135.
- Dring, M.: 1970. Photoperiodic effects in microorganisms. in P. Halldal (ed.), Photobiology of microorganisms. Wiley Interscience London. pp. 345–368.
- Dubey, S. and Haldar, C. 1997. Environmental factors and annual harderian-pineal-gonadal interrelationship in Indian jungle bush quail, Perdicula asiatica. *Gen. Comp. Endocrin.* **106**, 17–22.
- Dunlap, J. 1993. Genetic analysis of circadian clocks. A.R.Physiol. 55, 683–728.
- Dunlap, J. 1998. Common threads in eukaryotic circadian systems. Current Opinion in Genetics and Development 8, 400–406.
- Dunlap, J. 1999. Molecular bases for circadian clocks. Cell 96, 271–290.
- Dunlap, J. 2000. A new slice on an old problem. Nature Neuroscience 3, 305–306.
- Dunlap, J. and Feldman, J. 1988. On the role of protein synthesis in the circadian clock of Neurospora crassa. *Proc. NAS USA* 85, 1096–1108.
- Dunlap, J. and Hastings, J. 1981. The biological clock in Gonyaulax controls luciferase activity by regulating turnover. J Biol Chem 256, 10509–10518.
- Dunlap, J., Loros, J., Crosthwaite, S., Liu, Y., Garceau, N., Bell-Pedersen, D., Shinohara, M., Luo, C., Collett, M., Cole, A. and

Heintzen, C.: 1998. The circadian regulatory system in Neurospora. in M. Chaddick, S. Baumberg, D. Hodgson and M. Phillips-Jones (eds), *Microbial Responses to Light* and *Time*. University Press Cambridge.. pp. 279–295.

- Dunlap, J., Taylor, J. and Hastings, J.: 1981. The control and expression of bioluminescence in dinoflagellates. in K. Nealson (ed.), *Bioluminescence: Current perspectives.*. Burgess Publ. Co, Minneapolis MN.
- Dushay, M., Rosbash, M. and Hall, J. 1989. The disconnected visual system mutations in Drosophila drastically disrupt circadian rhythms. J. Biol. Rhythms 4, 1–27.
- Dushkov, B. and Komolinskii, F.: 1968. Rational establishment of cosmonaut work schedules. in M. Gworski (ed.), The Psychophysiology of the labor of astronauts. Foreign Division Clearinghouse, Department of Commerce.
- Duysens, L. and Amesz, J. 1957. Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the nearultraviolet and visible region.. *Biochim. Biophys. Acta* 24, 19–26.
- Eastman, C., Boulos, Z., Terman, M., Campbell, S., Dijk, D. and Lewy, A. 1995. Light treatment for sleep disorders: Consensus report. VI. Shift work. *Journal of Biological Rhythms* 10, 157–164.
- Eastman, C., Young, M., Fogg, L., Liu, L. and Meaden, P. 1998. Bright light treatment of winter depression: A placebo-controlled trial. Archives of General Psychiatry 55, 883–889.

Ebeling 1994.

Eckhardt, D. and Engelmann, W. 1984. Involvement of plasmalemma-ATPases in circadian rhythms of succulent herb Kalanchoe blossfeldiana (Crassulaceae).. Ind. J. Exp. Biol. 22, 189–194.

Edel 2001.

- Edery, I. 2000. Circadian rhythms in a nutshell. *Physiological Genomics* **3**, 59–74.
- Edery, I., Zwiebel, L., Dembinska, M. and Rosbash, M. 1994. Temporal phosphorylation of the Drosophila period protein.. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**, 2260–2264.
- Edgar, D. and Dement, W. 1991. Regular scheduled voluntary exercise synchronizes the mouse clock. Am. J. Physiol. 261, R928–933.
- Edgar, D., Dement, W. and Fuller, C. 1993a. Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: Evidence for opponent processes in sleep-wake regulation. J. Neurosc. 13, 1065– 1079.
- Edgar, D., Kilduff, T., Martin, C. and Dement, W. 1991a. Influence of running wheel activity on free-running sleep/wake and drinking circadian rhythms in mice. *Physiology and Behavior* 50, 373–378.
- Edgar, D., Martin, C. and Dement, W. 1991b. Activity feedback to the mammalian circadian pacemaker: Influence on observed measures of rhythm period length. Journal of Biological Rhythms 6, 185–199.
- Edgar, D., Miller, J., Prosser, R., Dean, R. and Dement, W. 1993b. Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. J. Biol. Rhythms 8, 17–31.
- Edgar, D., Reid, M. and Dement, W. 1997. Serotonergic afferents mediate activitydependent entrainment of the mouse circadian clock. *American J. Physiol.* 273, R265– 269.

Edmunds, L.: 1988. Cellular and molecular bases of biological clocks.. Springer.

Edwards and et al. 1996.

Egan, E., Franklin, T., Hilderbrand-Chae, M., McNeil, G., Roberts, M., Schroeder, A., Zhang, X. and Jackson, F. 1999. An extraretinally expressed insect cryptochrome with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants.. J. Neurosci. 19, 3665– 3673.

Ehrenstein n.d., shift work proposals.

- Ehret, C., Potter, V. and Dobra, K. 1975. Chronotypic action of theophylline and of pentobarbital as circadian Zeitgebers in the rat. *Science* 188, 1212–1215.
- Eisele, L., Kass, L. and Barlow, R. 1982. Circadian clock generates optic nerve activity in the excised Limulus brain. *Biol. Bull.* 163, 382.
- Emery, I., Noveral, J., Jamison, C. and Siwicki, K. 1997. Rhythms of Drosophila period gene expression in culture. *Proc. Nat. Acad. Sci.* US 94, 4092–4096.
- Emery, P., So, W., Kaneko, M., Hall, J. and Rosbash, M. 1998. CRY, a Drosophila clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* **95**, 669–679.
- Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Förster, C., Emery-Le, M., Hall, J. and Rosbash, M. 2000. Drosophila CRY is a deep brain photoreceptor. *Neuron* 26, 493–504.

Emlen and Emlen n.d.. Auk 83, 361–363.

Endo et al 1981. Sleep 4, 319.

Endres, K.-P. and Schad, W.: 1997. Biologie des Mondes. Mondperiodik und Lebensrhyrthmen. Hirzel, Leipzig.

- Engelmann, W. 1960. Endogene Rhythmik und photoperiodische Blühinduktion bei Kalanchoe.. *Planta 55, 496-511*.
- Engelmann, W. 1966. Effect of light and dark pulses on the emergence rhythm of Drosophila pseudoobscura.. *Experientia 22, 606-608*.
- Engelmann, W. 1967. Tagesrhythmisches Schlüpfen von Drosophila pseudoobscura und tagesrhythmische Blütenblattbewegung von Kalanchoe blossfeldiana als Überlagerung von An- und Aus-Rhythmen. Nachrichten der Akad. Wiss. Göttingen II Mathem.-Physikal. Klasse 1967(10), 141.
- Engelmann, W. 1973. A slowing down of circadian rhythms by lithium ions.. Zeitschr. Z. Naturforsch. 28c, 733-736.
- Engelmann, W.: 1987. Effects of lithium salts on circadian rhythms.. in A. Halaris (ed.), Neuropsychiatric disorders and disturbances in the circadian system of man. Elsevier. pp. 263–289.
- Engelmann, W.: 1996. Leaf movement rhythms as hands of biological clocks.. in H. Greppin, R. Degli Agosti and M. Bonzon (eds), Vistas on Biorhythmicity. University of Geneva. pp. 51–76.

Engelmann, W. 1999. Rhythms in organisms.

- Engelmann, W. and Antkowiak, B. 1998. Ultradian rhythms in Desmodium (Minireview). *Chronobiol. Internat.* 15, 293–307.
- Engelmann, W. and Böhm 1974. Turgoraffecting substances such as polyethylene glycol do not affect the circadian oscillator.
- Engelmann, W. and Heilemann, M.: 1981. Effects of temperature on the circadian rhythm of Kalanchoe.. in H. Halberg, L. Scheving, E. Powell and D. Hayes (eds), XIII Intern. Conf., Proceedings. Publ. House 'Il Ponte', Milano,. pp. 263–268.

- Engelmann, W. and Johnsson, A.: 1998. Rhythms in organ movement. in P. Lumsden and A. Millar (eds), *Biological rhythms* and photoperiodism in plants. Environmental Plant Biology. Bios Scientific Publishers Oxford, Washington DC.
- Engelmann, W. and Klemke, W.: 1983. *Biorhythmen.*. Biol. Arbeitsbeher 34. Quelle und Meyer Heidelberg.
- Engelmann, W. and Mack, J. 1978. Different oscillators control the circadian rhythm of eclosion and activity in Drosophila. J. Comp. Physiol. 127, 229–237.
- Engelmann, W. and Schrempf, M. 1979. Membrane models for circadian rhythms. *Photo*chem. Photobiol. Reviews 5, 49–86.
- Engelmann, W. and Vielhaben, V. 1965. Wirkung verschiedener Zucker auf die Kalanchoe-Blütenblattbewegung.. Z. Pflanzenphysiol. 55, 54-58.
- Engelmann, W., Eger, I., Johnsson, A. and Karlsson, H. 1974. Effect of temperature pulses on the petal rhythm of Kalanchoe: An experkmental and theoretical study.. Intern. J. Chronobiol. 2, 347-358.
- Engelmann, W., Förster, C. and Smietanko, A. n.d.. Flies: This might indicate, that those animals live longer, the circadian rhythm of which was intact under the continuous light conditions until the very end of their life. *unpublished*.
- Engelmann, W., Johnsson, A., Kobler, H. and Schimmel, M. 1978. Attenuation of the petal movement rhythm of Kalanchoe with light pulses. *Physiol. Plant.* 43, 68–76.
- Engelmann, W., Pflug, B., Klemke, W. and Johnsson, A.: 1983. Lithium-induced change of internal phase relationship of circadian rhythms in humans and other observations.

in T. Wehr and F. Goodwin (eds), *Circadian rhythms in psychiatry*. Boxwood Press, Pacific Grove, California. pp. 89–107.

- Engelmann, W., Sommerkamp, A., Veit, S. and Hans, J. 1997. Methyl-jasmonate affects the circadian petal movement of Kalanchoe flowers.. *Biol. Rhythm Res.* 28, 377–390.
- Enright, J. 1971a. Heavy water slows biological timing processes. Z. vergl. Physiologie 72, 1– 16.
- Enright, J. 1971b. The internal clock of drunken isopods. Z. vergl. Physiologie 75, 332– 346.
- Enright, J.: 1972. When the beachhopper looks at the moon. Animal orientation and navigation. National Aeronautics and Space Administration, Washington. pp. 523–555.
- Enright, J.: 1980. The timing of sleep and wakefulness. in v. Braitenberg (ed.), Studies of brain function. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Enright, J.: 1981. Data analysis. in J. Aschoff (ed.), Handbook of behavioral neurobiology.
  Vol. 4. Plenum Press, New York, London. chapter 21-39.
- Enright, J. 1982. Sleep movements of leaves: In defense of Darwin's interpretation.. Oecologia 54, 253–259.
- Erkert, H. 1969. Die Bedeutung des Lichtsinnes für Aktivität und Raumorientierung der Schleiereule (Tyto alba guttata Brehm). Z. vergl. Physiologie 64, 37–70.
- Erkert, H. 1974. Der Einfluss des Mondlichtes auf die Aktivitätsperiodik nachtaktiver Säugetiere. *Oecologia* 14, 269–287.
- Erkert, H. 1976. Lunarperiodic variation of the phase-angle difference in nocturnal ani-

mals under natural Zeitgeber-conditions near the equator. International J. Chronobiology 4, 125–138.

- Esashi, Y. 1960. Studies on the formation and sprouting of aerial tubers in Begonia evansiana Andr. IV. Cutting method and tuberizing stages. Sci. Rep. Tohoku Univ. 26, 239–246.
- Esashi, Y. 1961. Studies on the formation and sprouting of aerial tubers in Begonia evansiana Andr. VI. Photoperiodic conditions for tuberization and sprouting in the cutting plants. Sci. Rep. Tohoku Univ. 27, 101–112.
- Esch, P., Techel, D., Schimmoller, N. and Rensing, L. 1995. Heat shock effects on the circadian rhythm of protein synthesis and phosphorylation of ribosomal proteins in Gonyaulax polyedra.. *Chronobiology International* 12, 369–381.
- Eskin, A. 1969. phase relationship of the internal oscillator to the environmental rhythm depends on its period length.
- Eskin, A. 1977. Neurophysiological mechanisms involved in photo-entrainment of the circadian rhythm from the Aplysia eye. J. Neurobiol. 8, 273–299.
- Eskin, A. 1982. Differential effects of amino acids on the period of the circadian rhythm from the Aplysia eye. *J. Neurobiol.* **13**, 231– 239.
- Esseveldt, L., Lehman, M. and Boer, G. 2000. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Re*search Reviews 33, 34–77.
- Evans, L.: 1969. The induction of flowering. Some case histories.. Macmillan of Australia.
- Evans, M. 1991. Gravitropism. Interaction of sensitivity modulation and effector distribution. *Plant Physiol.* 95, 1–5.

- Everson, C., Bergman, B. and Rechtschaffen, A. 1989. Sleep deprivation in the rat. III: Total sleep deprivation. *Sleep* **12**, 13–21.
- Ewing, E. and Struik, P. 1998. Tuber formation in potato: Induction, initiation and growth. *Hort. Rev.* 14, 89–197.

Exley and Corker 1965. Biochem J 95, 54P.

- Fahrenbach, W. 1973. The morphology of the Limulus visual system. V. Protocerebral neurosecretion and ocula innervation. Z. Zellf. 144, 153–166.
- Fahrenbach, W. 1981. The morphology of the Limulus visual system. VII. Innervation of photoreceptor neurons by neurosecretory efferents. *Cell Tissue Res.* **216**, 655–659.
- Feierman, J. 1982. Nocturnalism: an ethological theory of schizophrenia. *Med-Hypotheses* 9, 455–479.
- Feldman, J. 1982. Genetic approaches to circadian clocks. Annual Review Plant Physiol. 33, 583-xx.
- Feldman, J. 1983. Genetics of circadian clocks. Bioscience 33, 426–431.
- Feldman, J. and Atkinson, C. 1978. Genetic and physiological characterization of a slow growing circadian clock mutant of Neurospora crassa. *Genetics* 88, 255–265.
- Feldman, J. and Dunlap, J. 1983. Neurospora crassa: A unique system for studying circadian rhythms. *Photochem. Photobiol. Rev.* 7, 319–368.
- Feldman, J. and Hoyle, M. 1976. Complementation analysis of linked circadian clock mutants of. 82, 9–.
- Feldman, J., Gardner, G. and Denison, R.: 1979. Genetic analysis of the circadian clock of Neurospora. *in* M. Suda, O. Hayaishi and

H. Nakagawa (eds), *Biological rhythms and their central mechanism*. Naito Foundation. Elsevier / North-Holland Biomedical Press. pp. 57–66.

- Ferraro, J., Dorsett, J., Wagner, T., Yun, J. and Bartke, A. 1994. Overexpression of growth hormone genes in transgenic mice shortens free-running periods in constant light. *Biological Rhythm Research* 25, 315–328.
- Field, J. 1974. Das Experiment: Eine oszillierende Reaktion.. Chemie in unserer Zeit 7, 171–176.
- Figala, J., Hoffmann, K. and Goldau, G. 1973. Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster Phodopus sungorus Pallas.. Oecologia 12, 89–118.
- Finley, C., Gorman, M., Tuthill, C., Zucker, I. and et al. 1995. Long-term reproductive effects of a single long day in the Sibirian hamster (Phodopus sungorus). J. Biolog. Rhythms 10, 33–41.
- Fleissner 1972. circadian system changes the sensitivity of the eyes in scorpions and beetles by several orders of magnitudes using different mechanisms.
- Fleissner, G. 1974. Circadiane Adaptation und Schirmpigmentverlagerung in den Sehzellen der Medianaugen von Androctonus australis L. (Buthidae, Scorpiones). J. comp. Physiol. 91, 399–416.
- Fleissner, G. and Fleissner, G.: 1985. Neurobiology of a circadian clock in the visual system of scorpions. in F. Barth (ed.), Neurobiology of Arachnids. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 351–375.
- Fleissner, G. and Fleissner, G.: 1988. Efferent control of visual sensitivity in arthropod eyes: with emphasis on circadian rhythms.. Fischer Stuttgart, New York.

- Fleissner, G. and Fleissner, G.: 2001a. Perception of natural Zeitgeber signals. in V. Kumar (ed.), Biological rhythms. Narosa Publ.House. New Delhi. pp. 83–93.
- Fleissner, G. and Fleissner, G.: 2001b. Retinal circadian rhythms. in V. Kumar (ed.), Biological rhythms. Narosa Publ.House. New Delhi. pp. 71–82.
- Florant, G., Hill, V. and Ogilvie, M.: 2000. Circadian rhythms of body temperature in laboratory and field marmots (Marmota flaviventris). in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), Life in the cold. Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 223–231.
- Fogel, M. and Hastings, J. 1971. A substrate binding protein in the Gonyaulax bioluminescence reaction. Arch. Biochem. Biophys. 142, 310–321.
- Follett, B.: 1982. Photoperiodic physiology in animals. in J. Brady (ed.), Biological time keeping. Soc. Exp. Biol. Seminar 14. Cambridge University Press.

Follett, B. 1993.

- Follett, B. and Follett, D. 1985. The involvement of rhodopsin-like photopigment in the photoperiodic response of the Japanese quail. J.Comp. Physiol. A157, 519–528.
- Follett, B. and Pearce, K. 1990. Photoperiodic control of the termination of reproduction in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). *Proc. Royal Soc. London B: Biol. Sciences* 242, 225–230.
- Follett, B., Mattocks, P. and Farner, D. 1974. Circadian function in the photoperiodic induction of gonadotrophin secretion in the white-crowned sparrow. *Proceedings of* the National Academy of Sciences, U.S.A. 71, 1666–1669.

Follett, B., X and X 1998.

Forel 1910.

- Förster, C. and Engelmann, W. 1988. Thalassomyxa australis rhythmicity III. Entrainment by combination of different Zeitgeber.. J. Interdisc. Cycle Res. 19, 275–288.
- Fortanier, E. 1969. The influence of temperature, light energy and photoperiod on flowering of Brodiaea laxa Wats. Neth. J. agric. Sci. 17, 176–182.
- Foster, R. 1998. Shedding light on the biological clock. Neuron 20, 829–832.
- Foster, R., Argamaso, S., Coleman, S., Colwell, C., Lederman, A. and Provencio, I. 1993.
  Photoreceptors regulating circadian behavior: A mouse model. *Journal of Biological Rhythms Suppl.*) 8, S17–S23.
- Foster, R., Provencio, I., Hudson, D., Fiske, S., DeGrip, W. and Menaker, M. 1991. Circadian photoreception in the retinally degenerated mouse (rd/rd). *Journal of Comparative Physiology* 169, 39–50.
- Foy, R. and Smith, R. 1980. Br. Phycol. J. 15, 139–150.
- Francis, C. and Sargent, M. 1979. Effects of temperature perturbations on circadian conidiation in Neurospora. *Plant Physiology* 64, 1000–1004.
- Franke, H. 1986. The role of light and endogenous factors in the timing of the reproductive cycle of Typosyllis prolifera and some other polychaetes. Am. Zool. 26, 433–445.
- Frelinger, J., Motulsky, H. and Woodward, D. 1976. Effects of chloramphenicol on the circadian rhythm of Neurospora crassa. *Plant Physiol.*

- French, A. 1985. Allometries of the duration of torpid and euthermic intervals during mammalian hibernation: A test of the theory of metabolic control of the timing of changes in body temperature. J. Comp. Physiol. 156B, 13–19.
- Friesen, W., Block, G. and Hocker, C. 1993. Formal approaches to understandind biological oscillators. Ann. Rev. Physiol. 55, 661– 681.
- Frisch, K.: 1950. Die Sonne als Kompaß im Leben der Bienen.
- Frisch, K. 1965. Tanzsprache und Orientierung der Bienen. Springer Berlin.
- Fritz, B., Kasai, S. and Matsui, K. 1990a. Blue light photoreception in Neurospora circadian rhythm: Evidence for involvement of the flavin triplet state.. *Photochem Photobiol* 51, 607–610.
- Fritz, L., Morse, D. and Hastings, J. 1990b. The circadian bioluminescence rhythm of Gonyaulax is related to the daily variations in the number of light-emitting organelles.. J Cell Sc. 95, 321–328.
- Fritz, L., Stringher, C. and Colepicolo, P. 1996. Imaging oscillations in Gonyaulax: A chloroplast rhythm of nitrate reductase visualized by immunocytochemistry.. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 29, 111– 117.
- Fröberg, J. 1977. Twenty-four-hour patterns in human performance, subjective and physiological variables and differences between morning and evening active subjects. *Biol. Psychol.* 5, 119–134.
- Fuhrberg and X 1996. Pterygophora Melatonin.

Fuller, C. 1981.

- Fungal Genetics Stock Center's C World Wide Web site n.d.. http://www.fgsc.net/animations/animate.htm.
- Furner 1996. Flowering: Furthermore it must be found out, where in the plant these genes function. This could be done by genetic sectors in transgenic plants or in irradiated plants.
- Gallon, J. 1981. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms.. *TIBS* xx, 19–23.

Gallon, J. 1993.

- Gallopin, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, P., Rossier, J., Audinat, E., Muhlethaler, M. and Serafin, M. 2000. Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *NATURE* 404, 992–995.
- Gander, P., Kronauer, P. and Graeber, R. 1985. Phase shifting two coupled circadian pacemakers: Implementation for jet lag. AJP 249, R704–719.
- Garceau, N., Liu, Y., Loros, J. and Dunlap, J. 1997. Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY.. Cell 89, 469–476.
- Gardner, G. and Feldman, J. 1980. The frq locus in Neurospora crassa: A key element in circadian clock organization. *Genetics* 96, 96.
- Gardner, G. and Feldman, J. 1981. Temperature compensation od circadian period length in clock mutants of Neurospora crassa. *Plant Physiology* **68**, 1244–xx.
- Garner, W.: 1948. in A. Murneek and R. Whyte (eds), *Vernalization and photoperiodism*. Chronica Botanica, Waltham, Mass.

- Garner, W. and Allard, H. 1920. Effect of the relative length of day and night and
  a. other factors of the environment on growth and reproduction in plants. J. agricult. Res. 18, 553–606.
- Garner, W. and Allard, H. 1923. Further studies in photoperiodism, the response of the plant to relative length of day and night. J. agr. Res. 23, 871–920.
- Gassner, G. 1918. Beiträge zur physiologischen Charakteristik sommer- und winterannueller Gewächse, insbesondere der Getreidepflanzen. Zeitschr. Botan. 10, 417.
- Geibel, N. 1987. Alles beginnt mit einer einzigen Zelle. Südwestpresse 28.10.1987.
- Geiser, F., Holloway, J., Körtner, G., Maddocks, T., Turbill, C. and Brigham, R.: 2000. Do patterns of torpor differ between free-ranging and captive mammals and birds?. *in* G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), *Life in the cold. Eleventh Int. Hibernation Symposium.* Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 95–102.
- Geiser, F., Hulbert, A. and Nicol, S.: 1996. in F. Geiser, A. Hulbert and S. Nicol (eds), Adaptations to the cold. Tenth international hibernation symposium. University of New England Press, Armidale. pp. 311–318.

Geispitz, K. 1965. Ent. Obozr. 44, 538.

- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H., Davis, F, C., Wilsbacher, L., King, D., Takahashi, J. and Weitz, C. 1998. Role of the clock protein in the mammalian circadian mechanism. *CI* 6, 263–280.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M. and Hofte, H. 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana.. *Plant Physiology* **114**, 295– 305.

- Genetics Stock Center's World Wide Web site n.d.. http://www.fgsc.net/, neurospora749a.jpg SEM micrographs.
- Gern and X 1986. The pineal and melatonin convey the photoperiodic information in the environment to effector organs.
- Geusz, M. and Block, G. 1992. The retinal cells generating the circadian small spikes in the Bulla optic nerve. J. Biol. Rhythms 7, 255– 265.
- Geusz, M. and Page, T. 1990. The circadian rhythm and photosensitivity of small impulses of the Bulla eye. Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology 166, 795–802.
- Geusz, M. and Page, T. 1991. An opsin-based photopigment mediates phase shifts of the Bulla circadian pacemaker. *Journal of Comparative Physiology* 168A, 565–570.
- Geusz, M., Foster, R., Degrip, W. and Block, G. 1997. Opsin-like immunoreactivity in the circadian pacemaker neurons and photoreceptors of the eye of the opisthobranch molluscs Bulla gouldiana. *Cell and Tissue Research* 287, 203–210.
- Gibbs 1981. even homeothermic animals possess a temperature-compensated circadian clock.
- Gibson, R. 1965. Rhythmic activity in littoral fish.. Nature 207, 544–545.
- Gibson, R. 1967. Experiments on the tidal rhythm of Blennius pholis. J. Marine Biology Ass. U.K. 47, 97–111.
- Gibson, R. 1971. Facrtors affecting the rhythmic activity of Blennius pholis (Teleostei). *Animal Behav.* **19**, 336–343.

- Giebultowicz, J. 2000. Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. Ann. Rev. Entomol. 45, 67–791.
- Giebultowicz, J., Ivanchenko, M. and Vollintine, T.: 2001. Organization of the insect circadian system: spatial and developmental of clock genes in peripheral tissues of Drosophila melanogaster. in G. Denlinger, D.L. (ed.), Insect Timing: Circadian Rhythmicity and Seasonality. Elsevier, Amsterdam.
- Giedke, H., Engelmann, W. and Reinhard, P. 1983. Free running circadian rest-activity cycle in normal environment. A case study.. *Sleep Res.*
- Gilmour, S., Zeevart, J., Schwenen, L. and Graebe, J. 1986. Gibberellin metabolism in cell-free extracts from spinach leaves in relation to photoperiod. *Plant Physiol.* 82, 190– 195.
- Glossop, N., Lyons, L. and Hardin, P. 1999. Interlocked feedback loops within the Drosophila circadian oscillator. *Science* 286, 766– 768.
- Glotzbach, S., Edgar, D., Boeddiser, M. and Ariagno, R. 1997. Biological rhythmicity in normal infants during the first three months of life. *Pediatrics* 94, 482–488.
- Goethe: 1968. Dichtung und Wahrheit. Vol. 9 of Bibliothek Deutscher Klassiker, Nationale Forschungs- und Gedenkstätten. Aufbau Verlag Berlin, Weimar.
- Golden, S., Ishiura, M., Johnson, C. H. and Kondo, T. 1997. Cyanobacterial circadian rhythms. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 327–354.
- Golden, S., Johnson, C. and Kondo, T. 1998. The cyanobacterial circadian system: A clock apart. Current Opinion in Microbiology 1, 669–673.

- Goldenberg, F. 1993. Sleep and biological rhythms in depression: Modifications induced by antidepressants. *Neurophysiologie Clinique* 23, 487–515.
- Goldman, B. 2001. Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. JBR 16, 283–301.
- Goldstein and X 1992. It was therefore presumed. that the REM-sleep is important for the development of the brain.
- Goltz n.d.. cerebral cortex is dispensable for sleep to occur in dogs.
- Gooch, V., Wehseler, R. and Gross, C. 1994. Temperature effects on the resetting of the phase of the Neurospora circadian rhythm.. *Journal of Biological Rhythms* 9, 83–94.
- Goodwin, B.: 1965. Oscillatory behavior in enzymatic control processes.. in G. Weber (ed.), Advances in enzyme regulation. Pergamon Press, Oxford.
- Gorman, M. and Zucker, I. 1997. Environmental induction of photononresponsiveness in the Siberian hamster, Phodopus sungorus. A. J. Physiol. 272, R887–895.
- Gorton, H., Williams, W., Binns, M., Gemmell, C., Leheny, E. and Shepherd, A. 1989. Circadian stomatal rhythms in epidermal peels from Vicia faba. *Plant Physiol.* **90**, 1329– 1334.
- Goss, R. 1969. Photoperiodic control of antler cycles in deer I. Phase shift and frequency changes. J. Exp. Zool. 170, 311–324.
- Goss, R. 1976. Photoperiodic control of antler cycles in deer III Decreasing versus increasing daylengths. J. Exp. Zoology 197, 307– 312.

- Goto, N., Kumagai, T. and Koornneef, M. 1991. Flowering responses to light-breaks in photomorphogenetic mutants of Arabidopsisi thaliana, a long-day plant. *Physiol. Plant.* 83, 209–215.
- Goto, R., Kaue, R., Morishita, M. and Nakashima, H. 1994. Effects of temperature on the circadian conidiation rhythm of temperature-sensitive mutants of Neurospora crassa. *Plant Cell Physiol.* 25, 613–618.
- Gradmann, D. and Buschmann, P.: 1996. Electrocoupling causes oscillations of ion transporters in plants. in H. Greppin, R. Degli Agosti and M. Bonzon (eds), Vistas on Biorhythmicity. University of Geneva. pp. 239– 268.
- Gradmann, H. 1922. Die Fünfphasenbewegung der Ranken. Jahrb Wiss Bot **61**, 169–204.
- Gradmann, H. 1971. Die Orientierung im Raume. *Studium Generale* **24**, 906–923.
- Graeber and et al. 1983. Human performance in transportation operations.
- Graham and McGrew 1980. synchronous menstruation in 18 pairs beeing very close friends.
- Green, D. 1998. 17.6 Organization of circadian rhythms and their evolution.
- Green, D. and Gilette, M. 1982. Circadian rhythms of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slices. *Brain Research* 245, 198–200 (283–288?).
- Gregory, F. 1936. The effect of length of day on the flowering of plants. *Sci. Hort.* 4, 143–.
- Gregory, F. and Purvis, O. 1936. Devernalization of winter rye by high temperature. *Nature* 138, 1013.
- Grell, K. 1985. Der Formwechsel des plasmodialen Rhizopoden Thalassomyxa australis n. G., n. Sp.. Protistologica 21, 215–233.

- Grell, K. 1987. Movie: Der Formwechsel von Thalassomyxa australis (Promycetozoidae)".
- Grigg, G. and Beard, L.: 2000. Hibernation by Echidna in mild climates: Hints about the evolution of endothermy. in G. Heldmaier and M. Klingenspor (eds), Life in the cold. Springer Berlin, Heidelberg, New York etc.. pp. 5–20.
- Grobbelaar, N., Huang, T. and Chow, T. 1986. Dinitrogen fixing endogenous rhythm in Synechococcus RF-1. *FEMS Microbiol. Letters* 37, 173–177.
- Groos, G. and Hendricks, J. 1982. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neuroscience Letters* **34**, 283–288.
- Gross, I., Hardeland, R. and Wolf, R. 1994. Circadian rhythm of tyrosine aminotransferase activity in Gonyaulax polyedra. *Biological Rhythm Research* 25, 51–58.
- Guantieri, V., Pepe, A., Zordan, M., Kyriacou, C., Costa, R. and Tamburro, A. 1999. Different period gene repeats tale 'turns' at finetuning the circadian clock. *Proc. Royal Soc. London* B266, 2283–2288.
- Guillemette, J., Hebert, M., Paquet, J. and Dumont, M. 1998. Natural bright light exposure in the summer and winter in subjects with and without complaints of seasonal mood variations. *Biological Psychiatry* 44, 622–628.
- Gumpelmayer 1949. Die Bewurzelung von Stecklingen unter dem Einfluß von Heteroauxin im Jahresrhythmus. *Phyton* **1**, 154–169.
- Gundel, A. and Spencer, M. 1992. A mathematical model of the human circadian system and its application to jet lag. *Chronobiol. Int.* 9, 148–159.

- Guo, H., Yang, H., Mockler, T. and Lin, C. 1998. Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science* 279, 1360– xx.
- Guyomarc 'h and Guyomarc 'h 1995. Moulting cycles in European quail (Coturnix coturnix coturnix) under constant photoperiodic conditions. *BRR* **26**, 292–305.
- Gwinner, E. 1967. Circannuale Periodik der Mauser und der Zugunruhe bei einem Vogel.. Naturwiss. 54, 447.
- Gwinner, E. 1968. Circannuale Periodik als Grundlage des jahreszeitlichen Funktionswandels bei Zugvögeln. Untersuchungen am Fitis (Phylloscopus trochilus) und am Waldlaubsänger (P. sibilatrix). J. Ornithol. 109, 70–95.
- Gwinner, E.: 1981. Circannual rhythms: Their dependence on the circadian system. in
  B. Follett and D. Follett (eds), Biological clocks in seasonal reproductive cycles. Wright, Bristol. pp. 153–169.
- Gwinner, E.: 1986. Circannual Rhythms. Endogenous annual clocks in the organization of seasonal processes.. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- Gwinner, E. and Dittami, J.: 1986. Adaptive functions of circannual clocks. in J. Boissin (ed.), Endocrine regulations as adaptive mechanisms to the environment. CNRS Public.
- Haapala, H. 1967. Studies on the endogenous rhythm of stomatal movements in Oxyria digyna (L.) Hill and Stellaria media (L.) Vill. Aquilo, Ser. Botanica 5, 120–135.
- Haberlandt, G.: 1905. Die Lichtsinnesorgane der Blätter. Engelmann Leipzig.
- Hagemeyer, J. and Waisel, Y. 1987. An endogenous circadian rhythm of transpiration

in Tamarix aphylla. *Physiologia Plantarum* **70**, 133–138.

- Hager, A., Menzel, H. and Krauss, A. 1971. Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Plan*ta 100, 47–75.
- Halaban, R. 1969. Effects of light quality on the circadian rhythm of leaf movement of a short day plant. *Plant Physiol.* 44, 973–977.
- Halaris, A.: 1987. Chronobiology and psychiatric disorders. Elsevier. New York, Amsterdam, London.
- Hall, J. 1998. Molecular neurogenetics of biological rhythms. J. Neurogenetics 12, 115–181.
- Hall, J.: 2002. Genetics and molecular biology of insect rhythms. *in* D. Saunders (ed.), *Insect clocks*.
- Hämmerling, J. 1963. Nucleo-cytoplasmatic interactions in Acetabularia and other cells. Annual Rev. Plant Physiol. 14, 65–92.
- Hamner, K. and Bonner, J. 1938. Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. *Bot. Gaz.* 100, 388–.
- Hamner, K. and Long, E. 1939. Localization of photoperiodic perception in Helianthus tuberosus. *Bot. Gazette* **101**, 81–90.
- Hangartner, R. 1997. Gravitropism, light and plant form. *Plant, Cell and Environm.* 20, 786–800.
- Hao, H., Allen, D. and Hardin, P. 1997. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in Drosophila melanogaster.. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3687–3693.
- Hard, J., Bradshaw, W. and Holzapfel, C. 1993.The genetic basis of photoperiodism and evolutionary divergence among populations of

the pitcher-plant mosquito, Wyeomyia smithii. *Am. Nat.* **142**, 457–473.

- Hardeland, R. 1980. Effects of catecholamines on bioluminescence in Gonyaulax polyedra (Dinoflagellata). Comp. Biochem. Physiol. 66C, 53–58.
- Hardeland, R. 1993. The presence and function of melatonin and structurally related indoleamines in a dinoflagellate, and a hypothesis on the evolutionary significance of these tryptophan metabolites in unicellulars. *Eyperientia* 49, 614–622.
- Hardeland, R.: 1995. Circadian rhythm of plastid movements in Pyrocystis acuta. in R. Hardeland (ed.), Cellular Rhythms and Indoleamines. Univ. of Göttingen, Göttingen. pp. 106–110.
- Hardeland, R. and Nord, P. 1984. Visualization of free-running circadian rhythms in the dinoflagellate Pyrocystis noctiluca. *Mar. Behav. Physiol.* **11**, 199–207.
- Hardeland, R., Fuhrberg, B., Uria, H., Behrmann, G., Meyer, T., Burkhardt, S. and Poeggeler, B. 1996. Chronobiology of indoleamines in the dinoflagellate Gonyaulax polyedra: Metabolism and effects related to circadian rhythmicity and photoperiodism.. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 29, 119–123.
- Harder, R. and Witsch, H. 1940. Über die Einwirkung von Kurztagsblättern auf im Langtag befindlicheBlätter und Stengelteile der gleichen Pflanze. Untersuchungen zur Frage nach einem formbeeinflussenden Wirkstoff. *Planta* **31**, 523–558.
- Harder, R. and Witsch, H. 1941. Über den Einfluss der Tageslänge. Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik 89, 341–411.

- Harris, E.: 1989. The Chlamydomonas sourcebook. Academic Press New York.
- Harris, M. and Milsom, W.: 2000. Is hibernation facilitated by an inhibition of arousal?. in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), Life in the cold. Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 241–250.
- Hartwig and Schweiger 1986. Cellular aspects of circadian rhythms.. JCS 4 Suppl., 181– 200.
- Harvey 1961. In Choristoneura funiferana it is the second larval stage, in which diapause is found.
- Hastings, J. 1959. Unicellular clocks. Ann.Rev.Microbiol.
- Hastings, J. 1960. Biochemical aspects of rhythms: phase shifting by chemicals.. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biology 25, 131–140.
- Hastings, J. 1994. Biological clocks. Mitteilungen der Alexander von Humboldt-Stiftung 63, 17–23.
- Hastings, J.: n.d.. Homepage. http://mcb.harvard.edu/hastings/dino.html.
- Hastings, J. and Dunlap, J. 1986. Cell.free components in dinoflagellate bioluminescence: The particulate activity: scintillons; the soluble components: luciferase, luciferin, and luciferin binding protein. *Meth. Enzym.* 135, 307–323.
- Hastings, J. and Sweeney, B. 1957. On the mechanism of temperature independence in a biological clock. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 43, 804–811.
- Hastings, J. and Sweeney, B. 1960. The action spectrum for shifting the phase of the

rhythm of luminescence in Gonyaulax polyedra.. J.Gen.Physiol. 43, 697–706.

- Hastings, J., Astrachan, L. and Sweeney, B. 1961. A persistent daily rhythm in photosynthesis. J.gen. Physiol. 45, 69–76.
- Hastings, J., Broda, H. and Johnson, C.: 1985.
  Phase and period effects of physical and chemical factors. Do cells communicate?. *in*R. Rensing and N. Jaeger (eds), *Temporal Order*. Springer. pp. 213–221.
- Hastings, M. and Maywood, E. 2000. Circadian clocks in the mammalian brain. *BioEassays* 22, 23–31.
- Hasunuma, K., Funadera, K., Shinohara, Y., Furukawa, K. and Watanabe, M. 1987. Circadian oscillation and light-induced changes in the concentration of cyclic nucleotides in Neurospora. *Current Genetics* 12, 127–xx.
- Hauenschild, C., Fischer, A. and Hofmann, D. 1968. Untersuchungen am pazifischen Palolowurm Eurydice viridis in Samoa. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 18, 254–295.
- Haus, E. and Halberg, F. 1972. Increased tolerance of leukemic mice to arabinosyl cytosine with schedule adjusted to circadian system. *Science* 177, 80–82.
- Heathcote, D. 1966. A new type of rhythmic plant movement: micronutation.. J Exp Bot 17, 690–695.
- Hegarty, T. 1978. The physiology of seed hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination: a review.. *Plant, Cell and environment* 1, 101–119.
- Hege, D., Stanewsky, R., Hall, J. and Giebultowicz, J. 1997. Rhythmic expression of a PER-reporter in the Malpighian tubules

brain-independent circadian clock. J. Biol. Rhythms 12, 300-308.

- Heideman and X 1990. tropical mouse Zygodontomys brevicauda does not exhibit a photoperiodic behavior.
- Heintzen, C., Loros, J. and Dunlap, J. 2000. VIVID, light adaptation and the circadian clock: Tha PAS protein VVD defines a feedback loop that represses light input pathways and regulates clock resetting. Cell.
- Heldmaier, G. and Klingenspro, M.: 2000. Life in the cold.. in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York.
- Heldmaier, G., Steinlechner, S., Ruf, T., Wiesinger, H. and Klingenspon, M. 1989. Photoperiodism and thermoregulation in vertebrates: Body temperature rhythms and thermogenic acclimation. J. Biological Rhythms 4, 251-265.
- Helfrich, C. 1986. Role of optic lobes in the regulation of locomotor activity rhythm in Drosophila melanogaster: Behavioral analysis of neural mutants. J. Neurogenet. 3, 321-343.
- Helfrich, C. and Engelmann, W. 1983. Circadian rhythms of the locomotor activity rhythm in Drosophila melanogaster and its mutants 'sine oculis' and 'small optic lobes'. Physiol. Entomol. 8, 257–272.
- Helfrich-Förster, C. 1996. Drosophila rhythms: From brain to behavior. Semin. Cell. Develop. Biol. 7, 791-802.
- Helfrich-Förster, C. 1997. Photic entrainment of Drosophila's activity rhythm occurs via retinal and extraretinal pathways. Biol. Rhythm Res. 28, S119.

- of decapitated Drosophila: evidence for a Helfrich-Förster, C. 1998. Robust circadian rhythmicity of Drosophila melanogaster requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. J. Comp. Physiol. A182, 435–453.
  - Helfrich-Förster, C. 2001a. The activity rhythm of Drosophila melanogaster is controlled by a dual oscillator system. J. Insect Physiology 47, xx.
  - Helfrich-Förster, C. 2001b. The neuroarchitecture of the circadian clock in the Drosophila brain. submitted.
  - Helfrich-Förster, C. and Engelmann, W.: 2001. Photoreceptors for the circadian clock of the fruitfly. in V. Kumar (ed.), Biological Rhythms. Narosa Publ. House. New Delhi. p. in press.
  - Helfrich-Förster, C. and Engelmann, W.: 2002. Photoreceptors for the circadian clock of the fruitfly. in V. Kumar (ed.), Biological Rhythms. Narosa Publ. House, Pvt.Ltd., New Delhi. New Delhi. pp. 94–106.
  - Helfrich-Förster, C., Stengl, M. and Homberg, U. 1998. Organization of the circadian system in insects. Chronobiol. Internat. **15**, 567–594.
  - Helfrich-Förster, C., Täuber, M., Park, J., Mühlig-Versen, M., Schneuwly, S. and Hofbauer, A. 2000. Ectopic expression of the neuropeptide pigment dispering factor alters behavioral rhythms in Drosophila melanogaster. Journal of Neurosciences 20, 3339-3353.
  - Helfrich-Förster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J. and Stanewsky, R. 2001. The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. Neuron **30**, 249–261.

- Hellebust, J., Terborgh, J. and Mcleod, G. 1967. The photosynthesis rhythm of Acetabularia c. II. Measurements of photoassimilation of carbon dioxid and the activities of enzymes of the reductive pentose cycle.. *Biol. Bull.* **130**, 670–678.
- Heller, H. and Glotzbach, S.: 1977. Thermoregulation during sleep and hibernation.
- Heller, H., Musacchia, X. and Wang, L.: 1986. in H. Heller, X. Musacchia and L. Wang (eds), Living in the cold. Physiological and biochemical adaptations. Elsevier, New York.
- Hellgren, M., Brogardh, T. and Johnsson, A. 1976. Effects of valinomycin on oscillatory transpiration of Avena leaves. Z. Pflanzenphysiol. 80, 251–260.
- Henfrey, A. 1852. The vegetation of europe.
- Hennessey, T., Freeden, A. and Field, C. 1993. Environmental effects on circadian rhythms in photosynthesis and stomatal opening. *Planta* 189, 369–376.
- Hennevin and X 1995. claims that the REM sleep consolidates memory performance.

Hensel 1981.

- Hensey, C. and Gautier, J. 1997. A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation. *Mech. Developm.* 69, 183–195.
- Henssen, A. 1954. Die Dauerorgane von Spirodela polyrrhiza (L.) Schleid, in physiologischer Betrachtung. *Flora* 141, 523–566.

Herbert 1972.

Herman 1991. There are large and small photoreceptor cells in the lateral eye of Limulus. Only the large cells show changes.

- Herman, E. and Sweeney, B. 1975. Circadian rhythm of chloroplast ultrastructure in Gonyaulax polyedra, concentric organization around a central cluster of ribosomes.. J. Ultrastr. Research 50, 347–354.
- Herman, K. and Strumwasser, F. 1984. Regional specializations in the eye of Aplysia, a neuronal circadian oscillator. J. Comp. Neurology 230, 593–613.
- Herzog, E. and Block, G. 1992. The retinal cells generating the circadian small impulses in the Bulla optic nerve. J. Biol. Rhythms 7, 255–268.
- Herzog, E. and Block, G. 1999. Keeping an eye on retinal clocks. *Chronobiology Internatio*nal 16, 229–247.
- Herzog, E., Powers, M. and Barlow, R. 1996. Limulus vision in the ocean day and night: Effects of image size and contrast. Visual Neuroscience 13, 31–41.
- Herzog, E., Silva, C. and et al. 1997. The bulla retinal circadian clock regulates spontaneous firing through tyrosine kinase and phosphatase activity. Society for Neuroscience Abstracts 23, 1324.
- Hess n.d.. certain areas in the brain, parasympatic and symphatic ones, the stimulation of which (4-6Hz, 2. 5-3. 5V) induces sleep or wakefullness.
- Hess, B. and Boiteux, A. 1971. Oscillatory phenomena in biochemistry. Ann. Rev. Biochem. 40, 237–258.
- Hess, D.: 1990. *Die Blüte*. 2 edn. Ulmer Stuttgart.
- Heyde, F., Wilkens, A. and Rensing, L. 1992. The effects of temperature on the circadian rhythms of flashing and glow in Gonyaulax polyedra: Are the two rhythms control-

led by two oscillators?. J. Biological Rhythms 7, 115–123.

- Highkin 1954. plants: better for organisms if their circadian oscillators are driven by the natural 24-hours-period.
- Hildebrandt, G., Moser, M. and Lehofer, M.: 1998. Chronobiologie und Chronomedizin: kurzgefaßtes Lehr- und Arbeitsbuch.. Hippokrates Verlag, Stuttgart. ISBN3-7773-1202-5.
- Hillman, W. 1956. Injury of tomato plants by continuous light and unfavorable photoperiodic cycles. Am.J.Bot. 43, 89–96.
- Hinton, H. 1953. Some adaptations of insects to environments that are alternately dry and flooded, with some notes on the habits of the Stratimyidae. *Trans. Soc. Brit. Entom.* 11, 209–.
- Hobson, J. and McCarley, R. 1977. The brain as a dream state generator: An activationsynthesis hypothesis of the dream process. *Am. J. Psychiatry* 134, 1335–1348.
- Hochberg, M. and Sargent, M. 1974. Rhythms of enzyme activity associated with circadian conidiation in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 120, 1164–1176.
- Hofbauer, A. and Buchner, E. 1989. Does Drosophila have seven eyes?. Naturwiss. 76, 335–336.
- Hoffmann, K. 1972. Melatonin inhibits photoperiodically induced testis development in a dwarf hamster. *Naturwissenschaften* 59, 218–219.
- Hoffmann, K. 1973. Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster Phodopus sungorus Pallas.. Oecologia 12, 89–118.

- Hoffmann, K. 1978. The influence of photoperiod and melatonin on testis size. J. comp. Physiol. 85, 267–.
- Hoffmann, K.: 1981a. Photoperiodism in vertebrates. in J. Aschoff (ed.), Handbook of behavioral neurobiology. Vol. 4. Plenum Press, New York, London. pp. 449–469.
- Hoffmann, K.: 1981b. The role of the pineal gland in the photoperiodic control of seasonal cycles in hamsters. in B. Follett and D. Follett (eds), *Biological clocks in seasonal* reproductive cycles. Wright, Bristol. pp. 237– 250.
- Hofman, M. and Swaab, D. 1993. Diurnal and seasonal rhythms of neuronal activity in the SCN of humans. J. Biological Rhythms 8, 283–295.
- Hofstetter and X 1995. xx Not only mutants, but strains can also differ in their circadian periods.
- Holmes, M. and Klein, W. 1986. Photocontrol of dark circadian rhythms in stomata of Phaseolus vulgaris L.. *Plant Physiol.* 82, 28–33.
- Homma, K. and Hastings, J. 1988. Cell cycle synchronization of Gonyaulax polyedra by filtration: Quantized generation time.. JBR 3, 49–58.
- Homma, K. and Hastings, J. 1989. Cell growth kinetics, division asymmetry and volume control at division in the marine dinoflagellata Gonyaulax polyedra: A model of circadian clock control of the cell cycle.. J Cell Sc. 92, 303–318.
- Homma, K., Haas, E. and Hastings, J. 1990. Phase of the circadian clock is accurately transferred from mother to daughter cells in the dinoflagellate Gonyaulax polyedra. *Cell Biophys.* 16, 85–97.

- Homma, K., Ohta, M. and Sakakibara, Y.: 1980. Surface and deep photoreceptors in photoperiodism in birds. *in* Y. Tanabe, K. Tanaba and T. Ookawa (eds), *Biological rhythms in birds*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 149–156.
- Hoofdakker, R.: 1966. Behaviour and EEG of drowsy and sleeping cats. PhD thesis. University of Groningen.
- Hopmans, P. 1971. Rhythms in stomatal opening of bean leaves. Mededelingen Landbouwhogeschool, Veenman and Zonen, Wageningen 71(3), 1–86.
- Hori, A., Minato, K. and Kobayashi, S. 1999. Warming-activated channels of warmsensitive neurons in rat hypothalamic slices. *Neurosci-Lett.* 275, 93–96.
- Hornstein, O., Kihlström, J. and Degerman, G. 1964. Acta endocrinol. 46, 608.
- Horton, T. and Yellon, S. 2001. Aging, reproduction, and the melatonin rhythm in the sibirian hamster. J. Biol. Rhythms 16, 243– 253.
- Horwitz, B., Lipson, E. and Schechtman, M. 1987. In vivo absorption-spectra of Neurospora-crassa white-collar photomutants. *Exp. Mycol.* **11**, 74–76.
- Howe, G., Gardner, G., Hackett, W. and Furnier, G. 1996. Phytochrome control of shortday-induced bud set in black cottonwood.. *Physiologia Plantarum* 97, 95–103.
- Huang, T. and Pen, S. 1994. Induction of a circadian rhythm in Synechococcus RF-1 while the cells are in a fluspended state". *Planta* 194, 436–438.
- Hunter-Ensor, M., Ousley, A. and Sehgal, A. 1996. Regulation of the Drosophila protein timeless suggests a mechanism for resetting

the circadian clock by light. *Cell* **84**, 677–685.

- I, R, W and et al. 2001.
- Ibata, Y., Okamura, H., Tanaka, M., Tamada, Y., Hayashi, S., Iijima, N., Matsuda, T., Munekawa, K., Takamatsu, T., Hisa, Y., Shigeyoshi, Y. and Amaya, F. 1999. Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20, 241– 268.
- Ichikawa, T., Hasegawa, K., Shimizu, I., Katsuno, K., Kataoka, H. and Suzuki, A. 1995. Structure of neurosecretory cells with immunoreactive diapause hormone pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, Bombyx mori.. Zoological Science (Tokyo) 12, 703–712.
- Ikeda, M., Su, Z.-H., Saito, H., Imai, K., Sato, Y., Isobe, M. and Yamashita, O. 1993. Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, Bombyx mori, by synthetic diapause hormone. Journal of Insect Physiology 39, 889–895.
- Illnerova, H.: 1991. The suprachiasmatic nucleus and rhythmic pineal melatonin production. in D. Klein, R. Moore and S. Reppert (eds), The suprachiasmatic nucleus: The mind's clock. Oxford University Press, New York. pp. 197–216.
- Illnerova, H. and Sumova, A. 1997. Photic entrainment of the mammalian rhythm in melatonin production. *Journal of Biological Rhythms* **12**, 547–555.
- Illnerova, H. and Vanecek, J. 1982. Twooscillator structure of pacemaker the rhythm controlling the circadian of N-acetyltransferase in the  $\operatorname{rat}$ pineal gland. Journal of Comparative Physiology A145, 539-548.

- Imamura, S.: 1967. *Physiology of flowering in Pharbitis nil.*. Jap. Soc. Plant Physiol. Tokyo.
- Imamura, S. and Marushige, Y.: 1967. The morphology and development of floral primordia. in S. Imamura (ed.), *Physiology of flowering in Pharbitis nil.*. Jap. Soc. Plant Physiol. Tokyo. pp. 7–13.
- Imamura, S., Muramatsu, M., Kitajo, S. and Takimoto, A. 1966. Varietal differences in photoperiodic behavior of Pharbitis nil Chois.. Bot. Mag. Tokyo 79, 714–721.
- Inouye, C., Shinohara, K., Tominaga, K., Takeuchi, J., Nagasaki, H., Isobe, Y., Fukuhara, C., Otori, Y., Yang, J., Cagampang, F., Yamazaki, S. and Tokumasu, A.: 1993. Circadian rhythms in peptides and their precursor messenger RNAs in the suprachiasmatic nucleus. in H. Nakagawa, Y. Oomura and K. Nagai (eds), International Symposion Osaka: New functional aspects of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. John Libbey and Co. London. pp. 219–233.
- Inouye, S. and Kawamura, H. 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic 'island' containing the suprachiasmatic nucleus.. *PNAS* **76**, 5962–5966.
- Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C., Tanabe, A., Golden, S., Johnson, C. and Kondo, T. 1998. Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* 281, 1519– 1523.
- Isobe, M. and Goto, T.: 1980. Diapause hormones. in Miller. T. A. (ed.), Neurohormonal techniques in insects. Springer New York, Heidelberg, Berlin. pp. 216–243.
- Isobe, M., Suwan, S., Kai, H., Katagiri, N. and Ikeda, M. 1995. Amino acid sequence of PIN

peptides conducting TIME (Time-Interval-Measuring-Esterase) activation for resumption of embryonic development in the silkworm, Bombyx mori. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5, 2851–2854.

- Israelsson, D. and Johnsson, A. 1967. A theory for circumnutations in Helianthus annuus.. *Physiol. Plant.* 20, 957–976.
- Iwasaki, H. and Dunlap, J. 2000. Microbial circadian oscillatory systems in Neurospora and Synechococcus: models for cellular clocks. *Current Opinion in Microbiology* 3, 189–196.
- Jacklet, J. 1969. Electrophysiological organization of the eye of Aplysia. J General Physiology 53, 21–42.
- Jacklet, J. 1976. Dye marking neurons in the eye of Aplysia. Comp. Biochem. Physiol. 55A, 373–377.
- Jacklet, J. 1980. Protein synthesis requirement of the Aplysia circadian clock tested by active and inactive derivatives of the inhibitor anisomycin. J. Exp. Biol. 85, 33–42.
- Jacklet, J. 1981. Circadian timing by endogenous oscillators in the nervous system: Toward cellular mechanisms. *Biol. Bull.* 160, 199–227.
- Jacklet, J.: 1989. Neuronal and cellular oscillators. Vol. 2 of Cellular clock Series. Marcel Dekker NY.
- Jacklet, J. and Barnes, S. 1993. Photoresponsive pacemaker neurons from the dissociated retina of Aplysia. *Neuroreport* 5, 209–212.
- Jackson and X 1997. light-labile phytochrome A, on the other hand, seems to be an essential part of this mechanism.
- Jackson, S. and Thomas, B.: 1998. The photoperiodic control of tuberization in potato. *Biological rhythms and photoperiodism*
*in plants*. Environmental Plant Biology. Bios Scientific Publishers Oxford, Washington DC. pp. 183–193.

- Jagota, A., de la Iglesia, H. and Schwartz, W. 2000. Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro.. Nature Neuroscience 3, 372–376.
- Jander, R. 1975. Ecological aspects of spatial orientation. Annual Rev. Ecol. Systems 6, 171–188.
- Jarett, L. 1984. Psychosocial and biological influences on menstruation: synchrony, cycle length, and regularity. *Psychoneuroendocri*nology 9, 21–28.
- Jauhar, P. and Weller, M. 1982. Psychiatric morbidity and time zone changes: A study of patients from Heathrow airport.. Brit. J. Psychiatry 140, 231–235.
- Jendralski, U. 1955. Die Jahresperiodizität in der Entwicklung der Laubmoose im Rheinlande. Decheniana 108, 105–163.
- Jenkins, J. 1954. Some effects of different daylengths and temperatures upon bulb formation in shallots. *Proc. Amer. Soc. hort. Sci.* 64, 311–314.
- Jewett, M. and Kronauer, R. 1998. Refinement of a limit cycle oscillator model of the effects of light on the human circadian pacemaker. J. Theoretical Biology 192, 455–465.
- Jin, X., Shearman, L. Weaver, D., Zylka, M., DeVries, G. and Reppert, S. 1999. A molecular mechanism regulating output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57– 68.
- Joffe, R., Moul, D., Lam, R., Levitt, A., Teicher, M., Lebegue, B., Oren, D., Buchanan, A., Glod. C. A., Murray, M. and et al 1993. Light visor treatment for seasonal affective

disorder: a multicenter study. *Psychiatry-Res.* **46**, 29–39.

- Johansson, E., Oscarson, P. and Lundborg, T. 1996. Effect of planting date on flowering time in wheat.. *Physiologia Plantarum* 96, 338–341.
- Johnson and et al 1975. wrong name. Johnsson Brogardh.
- Johnson, C. and Hastings, J. 1989. Circadian phototransduction: Phase resetting and frequency of the circadian clock of Gonyaulax in red light. *Journal of Biological Rhythms* 4, 417–437.
- Johnson, C., Golden, S. and Kondo, T. 1998a. Adaptive significance of circadian programs in cyanobacteria. *Trends in Microbiology* 6, 407–410.
- Johnson, C., Golden, S., Ishiura, M. and Kondo, T. 1996. Circadian clocks in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 21, 5–11.
- Johnson, C., Inoue, S., Flint, A. and Hastings, J. 1985. Compartmentalization of algal bioluminescence: Autofluorescence of bioluminescent particles in the dinoflagellate G. as studied with image-intensified video microscopy and flow cytometry.. J. Cell Biol. 100, 1435–1446.
- Johnson, C., Knight, M., Trewavas, A. and Kondo, T.: 1998b. A clockwork green: Circadian programs in photosynthetic organisms. in P. Lumsden and A. Millar (eds), Biological rhythms and photoperiodism in plants. Environmental Plant Biology. Bios Scientific Publishers Oxford, Washington DC.
- Johnson, C., Roeber, J. and Hastings, J. 1984. Circadian changes in enzyme concentration account for rhythm of enzyme activity in Gonyaulax.. Science 233, 1428–1430.

- Johnson, E., Bradley, M., Harberd, N. and Whitelam, G. 1994. Photoresponses of light grown phyA mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **105**, 141–149.
- Johnsson, A. 1971. Aspects of gravity induced movements in plants. *Rev. of Biophys.* 4, 277–320.
- Johnsson, A.: 1977. Zur Biophysik biologischer Oszillatoren. in W. Hoppe, H. Lohmann, W.Markl and H. Ziegler (eds), Biophysik. Ein Lehrbuch. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 441–449.
- Johnsson, A.: 1979. Growth movements not directed primarily by external stimuli. Circumnutation.. in W. Haupt and E. Feinleib (eds), *Encyclopedia of Plant Physiology.* Vol. 7. Springer Berlin, Heidelberg, New York.
- Johnsson, A.: 1983. Aspects on biophysics of biological oscillators.. in W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl and H. Ziegler (eds), Biophysics. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. pp. 820–828.
- Johnsson, A. and Fröberg, J. 1974. Work schedules and biological clocks. Ambio 4, 46–50.
- Johnsson, A. and Karlsson, H. 1972. A feedback model for biological rhythms. I. Mathematical description and basic properties of the model. *Journal of theoretical Biology* 36, 153–174.
- Johnsson, A., Engelmann, W., Pflug, B. and Klemke, W. 1980. Influence of lithium ions on human circadian rhythms. Z. Naturf. 35c, 503–507.
- Johnsson, A., Engelmann, W., Pflug, B. and Klemke, W. 1983. Period lengthening of human circadian rhythms by lithium carbonate, a prophylactic for depressive disorders... *Intern. J. Chronobiol.* 3, 129–147.

- Johnsson, A., Karlsson, H. and Engelmann, W. 1972. Phase shift effects in the Kalanchoe petal rhythm due to two or more light pulses. A theoretical and experimental study.. *Physiol. Plant.* 28, 134-142.
- Johnsson, A., Karlsson, H. and Engelmann, W. 1973. Phase shifts in the Kalanchoe petal rhythm, caused by light pulses of different duration. A theoretical and experimental study.. J. Chronobiol. 1, 147-156.
- Johnsson, A., Pflug, B., Engelmann, W. and Klemke, W. 1979. Effect of lithium carbonate on circadian periodicity in humans.. *Phar*macopsychiatry 12, 423–425.
- Johnston, J. and Ellison, J. 1982. Exact age determination in laboratory and field-caught Drosophila. J. Insect Physiol. 28, 773–779.
- Jores and Frees 1937. Tagesrhythmik der Schmerzempfindung.
- Jouvet, M. 1965. influence the REM-sleep of cats by pons lesions.
- Jouvet, M.: 1974. The role of monoaminergic neurons in the regulation and function of sleep. *in* O. Petre-Quadeno and J. Schlag (eds), *Basic sleep mechanisms*. Academic Press, New York. pp. 207–236.
- Jouvet, M. 1994. Paradoxical sleep mechanisms. *Sleep*.
- Jürgens, A., Witt, T. and Gottsberger, G. 1996. Reproduction and pollination in central European populations of Silene- and Saponaria species. *Botanica Acta* 109, 316–324.
- Kahn, L., Black, J. and Silber, M. 2001. Narcolepsy: New understandinds of irresistible sleep. *Mayo Clinic Proc.* 76, 185–194.
- Kai, H., Arai, T. and Yasuda, F. 1999. Accomplishment of time-interval activation of es-

terase A4 by simple removal of pin fraction. Chronobiology International 16, 51–58.

- Kai, H., Doi, S., Miwa, T. and Azuma, M. 1991. Discontinuity in temperature dependency of esterase A4 activation in vitro in relation to the diapause-duration timer. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Comparative Biochemistry* 99, 337–340.
- Kai, H., Kawashiri, K., Nakashima, S. and Azuma, M. 1995a. Fixed minimum duration of chilling critical to the termination of diapause, and effects of longer chilling on hatching mode in Bombyx eggs. J. Seric. Sci. Jpn. 57, 531–532.
- Kai, H., Kotani, Y., Miao, Y. and Azuma, M. 1995b. Time Interval Measuring Enzyme for Resumption of Embryonic Development in the Silkworm, Bombyx mori. *Journal of In*sect Physiology 41, 905–910.
- Kaldenhoff, R., Koelling, A. and Richter, G. 1993. A novel blue light- and abscisic acidinducible gene of Arabidopsis thaliana encoding an intrinsic membrane protein. *Plant Molecular Biology* 23, 1187–1198.
- Kallies, A., Gebauer, G. and Rensing, L. 1996. Light effects on cyclic nucleotide levels and phase shifting of the circadian clock in neurospora crassa. *Photochemistry and Photobio*logy **63**, 336–343.
- Kallies, A., Gebauer, G. and Rensing, L. 1998. Heat shock effects on second messenger systems of Neurospora crassa. Arch. Microbiol. 170, 191–200.
- Kambysellis and Heed n.d., Am. Naturalist 105, 31.
- Kandel, E. and Schwartz, J.: 1991. Principles of neural science.. 3 edn. Prentice Hall International Inc. London.

Kaneko and et al. 1996.

- Kaneko, M. 1998. Neural substrates of Drosophila rhythms revealed by mutants and molecular manipulations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 652–658.
- Kaneko, M., Helfrich-Förster, C. and Hall, J. 1997. Spatial and temporal expression of the period and the timeless genes in the developing nervous system of Drosophila: Newly identified pacemaker candidates and novel features of clock-gene product cyclings. J. Neurosci. 17, 6745–6760.
- Kaplan, E., Barlow, R., Renninger, G. and Purpura, K. 1990. Circadian rhythms in Limulus photoreceptors II. Quantum bumps. *Journal* of General Physiology 96, 665–685.
- Karakashian, M. and Schweiger, H. 1976. Circadian properties of the rhythmic system in individual nucleated and enucleated cells of Acetabularia mediterranea. *Experimental. Cell Research* 97, 366–377.
- Karlsson, H. and Johnsson, A. 1972. A feedback model for biological rhythms. II. Comparisions with experimental results, especially on the petal rhythm of Kalanchoe. J. Theor. Biol. 36, 175–194.
- Karve, A. and Mishal, B. 1966. The phenomenon of overshoot in the case of stomatal opening. *Natuswiss.* 53, 280.
- Karve, A., Deshmukh, A., Bhalerao, A. and Deshmukh, V. 1984. Photomorphogenetic regulation of reproductive development in groundnut and the significance of nyctinastic leaf movements.. New Phytol. 96, 535–543.
- Karve, A., Engelmann, W. and Schosser, G. 1961. Initiation of rhythmical petal movements in Kalanchoe blossfeldiana by transfer from continuous darkness to continuous light or vice versa.. *Planta* 56, 700–711.

Kastenmeier, B., Reich, W. and Engelmann, W. 1977. Effect of alcohols on the circadian petal movement of Kalanchoe and the rhythmic movement of Desmodium.. *Chronobiol.* 4, 122.

Katsuna 1998.

- Keller, H.: 2001. Kosmos Himmelsjahr. Sonne, Mond und Sterne im Jahreslauf. Franckh-Kosmos Verlag Stuttgart. 157-160.
- Kelly, D.: 1991a. Disorders of sleep and consciousness. in E. Kandel, J. Schwartz and T. Jessel (eds), *Principles of neural science*. 3 edn. Elsevier, New York, Amsterdam, London, Tokyo. pp. 805–819.
- Kelly, D.: 1991b. Sleep and dreaming. in E. Kandel, J. Schwartz and T. Jessell (eds), *Principles of neural science*. 3 edn. Prentice Hall International Inc. London.
- Kerfoot, W. 1967. The lunar periodicity of Specodogastra texana, a nocturnal bee (Hymenoptera, Halictidae). Animal Behav. 15, 479–486.
- Kerkhoff, G.: 1985. Individual differences in circadian rhythms. in S. Folkard and T. Monk (eds), *Hours of work*. John Wiley and Sons Lld., pp. 29–35.
- Kerling 1950. In some rice varieties differences of just one minute can induce flowering photoperiodically.
- Kerschbaum, H., Donato, R. and Hermann, A. 1997. Annexin-immunoreactive proteins in the nervous system and eye of the gastropods, Aplysia and Helix. *BRAIN RESE-ARCH* 746, 133–140.
- Keshavan, M., Reynolds, C. and Kupfer, D. 1990. Electroencephalographic recording in schizophrenia: A critical review. *Compr. Psychiatry* **31**, 34–47.

- Kessler, E. and Cygan, C. 1963. Seasonal changes in the nitrate-reducing activity of a green alga. *Experientia* 19, 89–90.
- Khalsa, S. and Block, G. 1990. Calcium in phase control of the Bulla circadian pacemaker. *Brain Research* 506, 40–45.
- Khalsa, S., Michel, S. and Block, G. 1993a. The effects of lithium on a neuronal in vitro circadian pacemaker. *Chronobiology International* 10, 321–330.
- Khalsa, S., Michel, S. and et al. 1995. The anesthetic agents pentobarbital and chloralose block phase shifts of a neuronal in vitro circadian pacemaker. *Neuroscience Letters* 14, 1– 8.
- Khalsa, S., Ralph, M. and Block, G. 1990. Chloride conductance contributes to period determination of a neuronal circadian pacemaker. *Brain Research* 520, 166–169.
- Khalsa, S., Ralph, M. and Block, G. 1991. Does low intracellular pH stop the motion of the Bulla circadian pacemaker?. *Journal of Neuroscience* 11, 2672–2679.
- Khalsa, S., Ralph, M. and Block, G. 1993b. The role of extracellular calcium in generating and in phase-shifting the Bulla ocular circadian rhythm. *Journal of Biological Rhythms* 8, 125–139.
- Khalsa, S., Whitmore, D. and Block, G. 1992. Stopping the Circadian Pacemaker with Inhibitors of Protein Synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 10862–10866.
- Khalsa, S., Whitmore, D., Bogart, B. and Block, G. 1996. Evidence for a central role of transcription in the timing mechanism of a circadian clock. *American Journal of Phy*siology **271**, C1646–C1651.

- Kiessig, R., Herz, J. and Sweeney, B. 1979. Shifting the phase of the circadian rhythm in bioluminescence in Gonyaulax with vanillic acid. *Plant Physiol.* 63, 324–327.
- Kihlström, J.: 1971a. A male sexual cycle. Current problems in fertility. Plenum Press, Uppsala.
- Kihlström, J. 1971b. A monthly variation in beard growth in one man. *Life Sciences* 10, 321–324.
- Kilias, R.: 1967. Coelenterata, Mollusca. Urania Tierreich. Wirbellose Tiere 1 (Protozoa bis Echiurida). Urania-Verlag Leipzig, Jena, Berlin, p. 386.
- King, D. and Takahashi, J. 2000. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. Annual Review of Neuroscience 23, 713–42.
- King, D., Zhao, Y., Sangoram, A., Wilsbacher, L., Tanaka, M., Antoch, M., Steeves, T., Vitaterna, M., Kornhauser, J., Lowrey, P., Turek, F. and Takahashi, J. 1997. Positional cloning of the mouse circadian Clock gene. *Cell* 89, 641–653.
- King, R., Evans, L. and Wardlaw, I. 1968. Translocation of the floral stimulus in Pharbitis nil in relation to that of assimilates. Z. Pflanzenphysiol. 59, 377–388.
- Kippert, F. 1987. Endocytobiotic coordination, intracellular calcium signalling and the origin of endogenous rhythms.. Ann.N.Y.Acad.Sc. 503, 476–495.
- Kippert, F. n.d.. (xx ref)medium is acidified by Synechococcus in a circadian way.
- Kippert, F. and Lloyd, D. 1995. Rhythmic CO\_{2} formation in fermentizing and in respiring Saccharomyces pombe cultures. *Mi*crobiol. 141, S888.

Kippert, F. and Lloyd, D.: 1996. Metabolism under control of the S.pombe ultradian clock. chapter 7.

Kirsch 1991.

- Kiss, J., Hertel, R. and Sack, F. 1989. Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of Arabidopsis thaliana. *Plan*ta 177, 198–206.
- Kjellman 1878. showed in experiments at the polarar circle, that plants develop faster under long day.
- Kjellman 1879. showed in experiments at the polarar circle, that plants develop faster under long day.
- Klapow, L. 1972. Natural and artificial rephasing of a tidal rhythm. J. comparitive Physiology 79, 233–258.
- Klebs, G. 1913. Über die Blütenbildung bei Sempervivum. *Flora* **111**/**112**, 128.
- Klein, K. and Wegmann, H. 1972. Das Verhalten des menschlichen Organismus bei Zeitzonenflügen. Med. 93, 1407–1414.
- Klein, K., Brüner, H., Hoffmann, H., Rehme, H., Stolze, J., Steinkoff, A. and Wegman, H. 1970. Circadian rhythms of pilots efficiency and effects of multiple time zone travel. *Aerospace Med.* 41, 125.
- Kleitman, N.: 1963. Sleep and wakefulness. University of Chikago Press, Chicago and London.

Kleitman, N. 1982. BRAC. Sleep 5, 311.

- Kleitman, N. and Engelmann, G. 1953. Sleep characteristics of infants.. J. appl. Physiol. 6, 269–282.
- Klemfuss, H. and Clopton, P. 1993. Seeking tau: A comparison of six methods. *Journal* of Interdisciplinary Cycle Research 24, 1–16.

- Kliman, R. and Lynch, G. 1992. Evidence for genetic variation in the occurrence of the photoresponse of the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. JBR 7, 161–173.
- Klippart, J. 1857. An essay on the origin, growth, diseases, varieties, etc. of the wheat plant. Ohio State Bd. Agr. Ann. Rept. 12, 562.
- Kloss, B., Price, J., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C. and Young, M. 1998. The Drosophila clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I. *Cell* 94, 97–107.
- Kluge, M. 1972. Die Sukkulenten: Spezialisten im CO2-Gaswechsel. *Biol. in unserer Zeit.*
- Kluge, M. and Ting, I.: 1978. Crassulacean acid metabolism: Analysis of an ecological adaptation. Springer Berlin, HD, NY.
- Knauth, P. and Rutenfranz, J.: 1975. Untersuchungen zur Circadianrhythmik der Körpertemperatur bei langsam und schnell rotierenden Schichtplänen.. Biologische Rhythmen und Arbeit. Bausteine zur Chronobiologie und Chronohygiene der Arbeitsgestaltung.. Springer Verlag, Wien, New York.
- Knoetzel, J. and Rensing, L. 1990a. Characterization of the photosynthetic apparatus from the marine dinoflagellate Gonyaulax polyedra. I Pigment and polypeptide composition of the pigment protein complexes.. J.Pl.Ph. 136, 271–279.
- Knoetzel, J. and Rensing, L. 1990b. Characterization of the photosynthetic apparatus from the marine dinoflagellate Gonyaulax polyedra. II Circadian rhythmicity of photosynthesis and the supramol. organization of pigment-protein complex.. J.Pl.Ph. 136, 280–288.

- Knott, J. 1934. Effect of localized photoperiod on spinach. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 31, 152.
- Koda, Y., Omer, E., Yoshihara, T., Shibata, H., Sakamura, S. and Okazawa, Y. 1988. Isolation of a specific potato tuber-inducing substance from potato leaves. *Plant Cell Physi*ol. 29, 1047–1051.
- Kogure, M. 1933. The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, Bombyx mori. J. Dept. Agric. Kyushu Univ. 4, 1.
- Kokkoris, C., Weitzman, E., Pollak, C., Spielman, A., Czeisler, C. and Bradlow, H. 1978. Long-term ambulatory temperature monitoring in a subject with a hypernychthemeral sleep-wake cycle disturbance.. *Sleep* 1, 177– 190.
- Kolker, D. and Turek, F. 1999. The search for circadian clock and sleep genes. *Journal of Psychopharmacology* **13 Supplement 1**, S5–S9.
- Kondo, J. and Kondo, N.: 1996. Structural aspects of complex of hibernation-specific proteins (HP). in F. Geiser, A. Hulbert and S. Nicol (eds), Adaptations to the cold. Tenth international hibernation symposium. University of New England Press, Armidale. pp. 351–355.
- Kondo, N.: 1997. Physiological and biochemical studies on hibernation control mechanism in mammalian hibernation. in O. Hayaishi and S. Inoue (eds), Sleep and sleep disorders: From molecular to behavior. Acad. Press, Tokyo. pp. 129–143.
- Kondo, T. and Ishiura, M. 1994. Circadian rhythms of cyanobacteria: Monitoring the biological clocks of individual colonies by bioluminescence. Journal of Bacteriology 176, 1881–1885.

- Kondo, T., Mori, T., Lebedeva, N., Aoki, S., Ishiura, M. and Golden, S. 1997. Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria.. *Science* 275, 224–227.
- Kondo, T., Strayer, C., Kulkarni, R., Taylor, W., Ishiura, M., Golden, S. and Johnson, C. 1993. Circadian rhythms in prokaryotes: Luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5672–5676.
- Kondo, T., Tsinoremas, N., Golden, S., Johnson, C., Kutsuna, S. and Ishiura, M. 1994. Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* 266, 1233–1236.
- Konopka, A. and et al. 1987. Buoyancy regulation Microcystis aeruginosa. *FEMS Microbi*ol. Ecol. 45, 135–142.
- Konopka, R. 1979. Genetic dissection of the Drosophila circadian system. *Federation Proc.* 38, 2602–2605.
- Konopka, R. and Benzer, S. 1971. Clock mutants of Drosophila melanogaster. Proc. Nat. Acad. Sciences, USA 68, 2112–2116.
- Konopka, R., Pittendrigh, C. and Orr, D. 1989. Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of Drosophila clock mutants. J. Neurogenet. 6, 1–10.
- Koop, H.-U., Schmid, R., Heunert, H.-H. and Milthaler, B. 1978. Chloroplast migration: A new rhythm in Acetabularia. *Protoplasma* 97, 301–310.
- Koorengevel, K., Beersma, D., Gordijn, M., den Boer, J. and van den Hoofdakker, R. 2000. Body temperature and mood variations during forced desynchronization in winter depression: A preliminary report. *Biological Psychiatry* 47, 355–358.

- Koorneef, M., Alonso-Blanco, C., Peters, A. and Soppe, W. 1998a. Genetic control of flowering time in Arabidopsis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 345–370.
- Koorneef, M., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C. and Peters, A. 1998b. Epistatic relationships among late flowering mutants of Arabidopsis. *Genetics* 148, 885–892.
- Körtner, G. and Geisler, F. 2000. The temporal organization of daily torpor and hibernation. *Chronobiology International* 17, 103–128.
- Koukkari and Warde n.d.. plant hormones affect circadian rhythms.
- Koumenis, C. and Eskin, A. 1992. The hunt for mechanisms of circadian timing in the eye of Aplysia. *Chronobiology International* 9, 201– 221.
- Koumenis, C., Nunez, M., Regueiro and et al. 1995. Identification of Three Proteins in the Eye of Aplysia, Whose Synthesis Is Altered by Serotonin (5-HT): Possible involvement of these proteins in the ocular circadian system. *Journal of Biological Chemistry* 270, 14619– 14627.
- Koumenis, C., Tran, Q. and Eskin, A. 1996. The use of a reversible transcription inhibitor, DRB, to investigate the involvement of specific proteins in the ocular circadian system of Aplysia. *Journal of Biological Rhythms* **11**, 45–56.
- Kraepelin 1896. Schizophrenia is the most common mental disease.
- Kramer 1953. Die Sonnenorientierung der Vögel.
- Krasnow, R., Dunlap, J., Taylor, W., Hastings, J., Vetterling, W. and Haas, E.: 1981. Measurements of Gonyaulax bioluminescence, including that of single cells.. in K. Neal-

son (ed.), *Bioluminescence: Current perspectives.*. Burgess Publ. Co, Minneapolis MN.

- Kripke, D. 1984. Critical interval hypothesis for depression.
- Krishnan, B., Dryer, S. and Hardin, P. 1999. Circadian rhythms in olfactory responses of Drosophila melanogaster. *Nature* 400, 375– 378.
- Kronauer, R., Czeisler, C., Pilato, S., Moore-Ede, M. and Weitzman, C. 1982. Mathematical model of the human circadian system with two interacting oscillators. *American Journal Physiol.* 242, R13–R17.
- Kroon, A.: 1998. Photoperiodic induction and termination of diapause in the spider mite Tetranychus urticae. PhD thesis. Amsterdam.
- Kuenzel, W. 1972. Dual hypothalamic feeding system in a migratory bird, Zonotrichia albicollis. Am. J. Physiology 223, 1138–1142.
- Kuijper, J. and Wiersum, L. 1936. Occurrence and transport of a substance causing flowering in the soy bean (Glycine max L.). Proc. Kon. nederl. Akad. Wet. 39, 1114.
- Kumke, J. n.d.. annual rhythm in Oxalis.
- L and L 1990. E198/diapause-schema.

Lach and X 1995.

- Lacroix, L., Strack, S. and et al. 1991. Axons of circadian pacemaker neurons in the eye of Bulla project to the central nervous system and the contralateral eye. *Comparative Biochemistry and Physiology* **98A**, 383–392.
- Laibach, F. 1943. Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. Bot. Arch. 44, 439–.

- Lajoie, Hanna, Fong, House and Zelin 1997. These phase shiftings lead to phase response curves which are normally obtained by dark pulses in other species with advances in the early sub.
- Lakin-Thomas, P. 1993. Evidence against a direct role for inositol phosphate metabolism in the circadian oscillator and the blue-light signal transduction pathway in Neurospora crassa. *Biochemical Journal* 292, 813–818.
- Lakin-Thomas, P. 1995. A beginner's guide to limit cycles, their uses and abuses. BRR 26, 216–232.
- Lakin-Thomas, P. 1996. Effects of choline depletion on the circadian rhythm in Neurospora crassa. *Biological Rhythm Research* 27, 12–30.
- Lakin-Thomas, P. 1998. Choline depletion, frq mutations, and temperature compensation of the circadian rhythm in Neurospora crassa. *Journal of Biological Rhythms* 13, 268–277.
- Lakin-Thomas, P. 2000. Circadian rhythms: new functions for old clock genes. *Trends in Genetics* 16, 135–142.
- Lakin-Thomas, P. and Brody, S. 1985. Circadian rhythms in Neurospora crassa: Interactions between clock mutations. *Genetics* 109, 49.
- Lakin-Thomas, P., Brody, S. and Cote, G. 1991. Amplitude model for the effects of mutations and temperature on period and phase resetting of the Neurospora circadian oscillator.. Journal of Biological Rhythms 6, 281– 298.
- Lakin-Thomas, P., Brody, S. and Cote, G. 1997. Temperature compensation and membrane composition in Neurospora crassa. *Chronobiology International* 14, 445–454.

- Lakin-Thomas, P., Cote, G. and Brody, S. 1990. Circadian rhythms in Neurospora crassa: Biochemistry and genetics. *Critical Re*views in Microbiology 17, 365–416.
- Lakin-Thomas, P., Gooch, V. and Ramsdale, M. 2001. Rhythms of differentiation and diacylglycerol in Neurospora. *Phil. Trans. R.* Soc. London B356, 1711–1715.
- Lam, R. and Levitan, R. 2000. Pathophysiology of seasonal affective disorder: a review. Journal of Psychiatry and Neuroscience 25, 469– 480.
- Lam, R. and Levitt, A.: 1999. Canadian consensus guide for the treatment of seasonal affective disorder. Ckinical and academic Publishing, Vancouver, B. C.
- Lam, R., Terman, M. and Wirz-Justice, A.: 1997. Light therapy for depressive disorders: Indications and efficacy.. in A. Rush (ed.), Mood disorders: Systematic medication management. Modern Problems of Pharmacopsychiatry;. Karger Basel London. pp. 215– 234.
- Lang, A. 1977. \* If a leaf is photoperiodically induced and grafted to a plant, which is photoperiodically insensitive, this plant will flower earlier.
- Lang, A. and Melchers, G. 1948. Auslösung der Blütenbildung bei Langtagpflanzen unter Kurztagbedingungen durch Aufpfropfung von Kurztagpflanzen. Z. Naturf. 3b, 108– 111.
- Lang, H.-J. 1970. Mondphasenabhängigkeit des Farbensehens. Umschau in Wissenschaft und Technik 1970(14), 445–446.
- Lankinen, P. and Lumme, J.: 1984. Genetic analysis of geographical variation in photoperiodic diapause and pupal eclosion

rhythm in Drosophila littoralis. Photoperiodic regulation of insect and molluscan hormones. Vol. 104 of Ciba Foundation Symposium. Pitman, London. pp. 97–114.

- Lapeyronie, M. 1968. Existence d'un cycle endogene concernant la faculte germinative de l'Oryzopsis miliacea. CRAS Paris 267, 1724–1726.
- Latz, M, I. and Lee, A. 1995. Spontaneous and stimulated bioluminescence of the dinoflagellate Ceratocorys horrida (Peridiniales)... *Journal of Phycology* **31**, 120–132.
- Laufer-Lutum, C., Hoermann, I. and Lysek, G. 1992. Continuous shortening the circadian conidiation rhythm in Neurospora crassa in short light-dark cycles with enhanced light intensities. J. Interdisc. Cycle Research 23, 1–8.
- Lee, C., Parikh, V., Itsukachi, T., Bae, K. and Edery, I. 1996. Resetting the Drosophila clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Neuron* 21, 857–867.
- Lee, K., Loros, J. and Dunlap, J. 2000. Interconnected feedback loops in the Neurospora circadian system. *Science*.
- Lee, T., Chan, C., Paterson, J., Janzen, H. and Blashko, C. 1997. Spectral properties of phototherapy for seasonal affective disorder: A meta-analysis. Acta Psychiatrica Scandinavica 96, 117–121.
- Lees, A.: 1955. The physiology of diapause in arthropods. Cambridge Univ. Press.
- Lees, A. 1963. The role of photoperiod and temperature in the determination of parthenogenetic and sexual forms in the aphid Megoura viciae Buckton - iii. Further properties of the maternal switching mechanism in apterous aphids. J. Insect Physiol. 9, 153–164.

- Lees, A. 1964. The location of the photoperiodic receptors in the aphid Megoura viciae Buckton. J. exp. Biology 41, 119–133.
- Lees, A.: 1970. Insect clocks and timers. Inaugural Lecture, Imperial College of Science and Technology.
- Lees, A. 1973. Photoperiodic time measurement in the aphid, Megoura viciae. JIP 19, 2279–2316.
- Lees, A. 1981. Action spectra for the photoperiodic control of polymorphism in the aphid Megoura viciae. J. Insect Physiology 27, 761–771.
- Lehman, M., Silver, R., Gladstone, W., Kahn, R., Gibson, M. and Bittman, E. 1987. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain.. Journal of Neurosciences 7, 1626– 1638.
- Leibenluft, E., Turner, E., Feldman-Naim, S., Schwartz, P., Wehr, T. and Rosenthal, N. 1996. Light therapy in patients with rapid cycling bipolar disorder: Preliminary results. *Psychopharmacology Bulletin* **31**, 705–710.
- Leloup, J. and Goldbeter, A. 2001. A molecular explanation for the long-term suppression of circadian rhythms by a single light pulse.. Amer. J. Physiol. (Regulatory, Integrative and Comparative Physiology).
- Leloup, J.-C. and Goldbeter, A. 1997. Temperature compensation of circadian rhythms: Control of the period in a model for circadian oscillations of the PER protein in Drosophila. *Chronobiol. Intern.* 14, 511–520.
- Leloup, J.-C. and Goldbeter, A. 1998. A model for circadian rhythms in Drosophila incorporating the formation of a complex between the per and tim protein. *JBR* **13**, 70–87.

- Lema, M., Echave, J. and Golombek, D. 2001. (Too many) mathematical models of circadian clocks?. *Biol. Rhythm Res.* 32, 285–298.
- Lema, M., Golombek, D. and Echave, J. 2000. A simple delay model of the circadian pacemaker. J. theor. Biol. 204, 565 – 573.
- Lemmer, B.: 1996. From the biological clock to chronopharmacology. Medpharm Scientific Publishers Stuttgart.

Lerchl, A. 1993.

- Lerchl, A. 1995. Sustained response of pineal melatonin to a single one-minute light pulse during night in Djungarian hamsters (Phodopus sungorus). *Neurosc. Lett.* **198**, 65–67.
- Levitan, I. and Benson, J. 1981. Neuronal oscillators in Aplysia: Modulation by serotonin and cyclic AMP. *TINS* pp. 38–41.
- Levitt, A., Wesson, V., Joffe, R., Maunder, R. and King, E. 1996. A controlled comparison of light box and head-mounted units in the treatment of seasonal depression. *Journal of Clinical Psychiatry* 57, 105–110.
- Lewis, A. and Saunders, D. 1987. A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock. I. Description of the model based on a feedback control system. J. theoret. Biology 128, 47–59.
- Lewis, C. 1953. Further studies on the effects of photoperiod and temperature on growth, flowering, and tuberization of tuberous rooted begonias. Proc. Am. Soc. hort. Sci. 54, 715– 752.
- Lewis, R. 1999. Control system models for the circadian clock of the New Zealand Weta, Hemideina thoracia (Orthoptera: Stenopelmatidae). Journal of Biological Rhythms 14, 480 – 485.

- Lewy, A., Ahmed, S., Jackson, J. and Sack, R. 1992. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. Chronobiology International 9, 380–392.
- Lewy, A., Bauer, V., Cutler, N., Sack, R., Ahmed, S., Thomas, K., Blood, M. and Latham-Jackson, J. 1998. Morning vs evening light treatment of patients with winter depression. Archives of General Psychiatry 55, 890–896.
- Li 1998. mutant det2 however shows the circadian behavior of the wild type. In this mutant an enzyme of the blue receptor pathway is affected.
- Li and X 1997. Phase shifting of the light-darkcycle every third day shortened the life time of mice, tumors grew to a larger extend and the immune system was suppressed. If these animals were treated with melatonin the unfavorable influence was absent.
- Lickey, M. 1981. Efferent fibers in the optic nerve do not instruct the eye about the reset. Instead, they activate or modulate the circadian functions in the eye.
- Lickey, M., Block, G., Hudson, D. and Smith, J. 1976. Circadian oscillators and photoreceptors in the gastropod, Aplysia. *Photochem. Photobiol.* 23, 253–273.
- Lickey, M., Wozniak, J., Block, G. and Hudson, D. 1977. The consequences of eye removal for the circadian rhythm of behavioral activity in Aplysia. J. Comp. Physiol. 118, 121–143.
- Lincoln, R., Cunningham, A. and Hamner, K. 1964. Evidence for a florigenic acid. *Nature* 209, 559–.
- Lindburg, D.: 1987. Seasonality of reproduction in primates. in G. Mitchell and J. Erwin (eds), Comparative primate biology. Vol. 2B.

Alan A. Liss, New York. chapter Behavior, cognition and motivation, pp. 167–218.

Linden, H., Ballario, P. and Macino, G. 1997. Review: Blue light regulation in Neurospora crassa. Fungal Genetics and Biology 22, 141– 150.

Lindgren 1997.

- Linser, H. 1950. Beobachtungen zur Jahreperiodik der Wachstumskorrelationen bei Keimlingen von Avena sativa. Phyton 2, 92–97.
- Linxxx 2000. phytochromes and cryptochromes in flowering A.t.
- Lippe, T. 1957. Kalanchoe turgor rhythm is shifted in respect to the water uptake rhythm by more than 3 hours.
- Liu, Y., Garceau, N., Loros, J. and Dunlap, J. 1997. Thermally regulated translational control of FRQ mediates aspects of temperature responses in the neurospora circadian clock. *Cell* 89, 477–486.
- Liu, Y., Merrow, M., Loros, J. and Dunlap, J. 1998. How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science* 281, 825–829.
- Liu, Y., Tsinoremas, N., Golden, S., Kondo, T. and Johnson, C. 1996. Circadian expression of genes involved in the purine biosynthetic pathway of the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7942. *Molecular Microbiology* **20**, 1071–1081.
- Livingston, B. 1907. Relative transpiration in Cacti. Plant World 10, 110–114.
- Lloyd, A. and Lloyd, D. 1993. Hypothesis: The central oscillator of the circadian clock is a controlled attractor. *Biosystems* 29, 77–85.
- Lloyd, D. and Gilbert, D.: 1998. Temporal organization of the cell division cycle in eukaryotic microbes. *in* M. Caddick, S. Baumberg, D. Hodgson and M. Phillips-Jones

(eds), Microbial responses to light and time. Vol. 56 of Soc. Gen. Microbiol. Symp.. Cambridge University Press. pp. 251–278.

- Lloyd, D. and Rossi, E.: 1992. Ultradian rhythms in life processes.. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 11–12. ISBN 0-387-19746-X,.
- Lloyd, D. and Volkov, E. 1990. Quantized cell cycle times: Interaction between a relaxation oscillator and ultradian clock pulses. *BioSys*tems 23, 305–310.
- Lockley, S., Skene, D., Thapan, K., English, J., Ribeiro, D., Haimov, I., Hampton, S., Middleton, B., von Schantz, M. and Arendt, J. 1998. Extraocular light exposure does not suppress plasma melatonin in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83, 369–3372.
- Lofts, B.: 1970. Animal photoperiodism. number 25 in Studies in Biology. Arnold, London.
- Lona, F. 1959. Results of twelve years of work on the photoperiodic responses of Perilla ocymoides. Koninkl. Nederl. Akademie van Wetenschappen Amsterdam C55, 701–707.
- Lopes da Silva, F. 1990. Neural mechanism underlying brain waves: From neural membranes to networks. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **79**, 81–93.
- Loros, J. 1995. The molecular basis of the Neurospora clock. *Semin. Neurosci.* 7, 3–13.
- Loros, J. 1998. Time at the end of the millenium: The Neurospora clock. Current Opinion in Microbiology 1, 698–706.
- Loros, J. and Dunlap, J. 2001. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in Neurospora. Ann. Rev. Physiol. 63, 757–794.

- Loros, J. and Feldman, J. 1986. Loss of temperature compensation of circadian period length in the frq-9 mutant of Neurospora crassa. *Journal of Biological Rhythms* **1**, 187–198.
- Loros, J., Denome, S. and Dunlap, J. 1989. Molecular cloning of genes under the control of the circadian clock in Neurospora. *Science* 243, 385–388.
- Loros, J., Richman, A. and Feldman, J. 1986. A recessive circadian clock mutant at the frq locus in Neurospora crassa. *Genetics* 114, 1095–1110.
- Loughrin, J., Hamilton-Kemp, T., Andersen, R. and Hildebrand, D. 1991. Circadian rhythm of volatile emission from flowers of Nicotiana sylvestris and N. suaveolens. *Phy*siologia Planta. 83, 492–496.
- Lovegrove, B.: 2000. Daily heterothermy in mammals: Coping with unpredictable environments. in G. Heldmaier and M. Klingenspor (eds), Life in the cold. Springer Berlin, Heidelberg, New York etc.. pp. 29–40.
- Lu, J. and Cassone, V. 1993.
- Lumme, J.: 1978. Phenology and photoperiodic diapause in northern populations of Drosophila. in H. Dingle (ed.), Evolution of insect migration and diapuse. Springer, New York. pp. 145–170.
- Lumme, J. 1982. The genetic basis of the photoperiodic timing of the onset of winter dormancy in Drosophila littoralis. Acta Universitatis Ouluensis 16(129 Biologica), 1–42.
- Lumme, J. and Lakovaara, S.: 1979. Seasonality and diapause in Drosophilids. in M. Ashburner, H. Carson and J. Thompson (eds), *The genetics and diapause in Drosophilids*. Vol. 3D.

- Lumsden, P.: 1998. Photoperiodic induction in short-day plants. in P. Lumsden and A. Millar (eds), Biological rhythms and photoperiodism in plants. Environmental plant biology. Bios Scientific Oxford. pp. 167–181.
- Lüning, K. 1970. Cultivation of Laminaria hyperborea in situ and in continuous darkness under laboratory conditions. *Helgol. wiss. Meeresunters.* 20, 79–88.
- Lüning, K.: 1980. Control of algal life history by daylength and temperature. *in* J. Price, D. Irvine and W. Farnham (eds), *The shore environment: Method and ecosystems*. Vol. 2: Ecosystems. Ac.Press London. pp. 915–945.
- Lüning, K. 1990. Circannual growth rhythm in a brown alga, Pterygophora californica. *Bot. Acta* 104, 157–162.
- Lüning, K. 1991. missing. missing.
- Lüttge, U. 1987. Carbon dioxid and water demand: Crassulacean acid metabolism (CAM), a versatile ecological adaptation exemplifying the need for integration in ecophysiological work. New Phytol. 106, 593– 629.
- Lüttge, U. and Beck, F. 1992. Endogenous rhythms and chaos in crassulacean acid metabolism. *Planta* **188**, 28–38.
- Lyman, C., Willis, A., Malan, A. and Wang, L.: 1982. in C. Lyman, A. Willis, A. Malan and L. Wang (eds), *Hibernation and torpor* in mammals and birds. Academic Press, New York.
- Lysenko, T. 1932. Bull. Jarov.. 4, 3.
- Maanson, C. 1965. Life Sciences 4, 329.
- MacDougal, D. 1903. The influence of light and darkness upon growth and development. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 2, 1.

- Macino, G., Arpaia, G., Linden, H. and Ballario, P.: 1998. Responses to blue light in Neurospora crassa. in M. Chaddick, S. Baumberg, D. Hodgson and M. Phillips-Jones (eds), Microbial Responses to Light and Time. University Press Cambridge.. pp. 213– 224.
- Mack, J. and Engelmann, W. 1978. Different oscillators control the circadian rhythm of eclosion and activity in Drosophila. J.comp. Physiol. 127, 229–237.
- Mack, J. and Engelmann, W. 1982. Circadian control of the locomotor activity in eye mutants of Drosophila melanogaster. *J.Interdisc.Cycle Res* pp. 313–323.
- Maestroni, G. and Conti, A. 1996. Melatonin and the immune-hematopoietic system therapeutic and adverse pharmacological correlates. *Neuroimmunomodulation* **3**, 325–332.
- Magruder, R. and Allard, H. 1937. Bulb formation in onions and length of day. J, agr. Res. 54, 715–752.
- Maier, R. 1973. Phase-shifting of the circadian rhythm of eclosion in Drosophila pseudoobscura with temperature pulses. J. interdisc. Cycle Res. 4, 125–135.
- Mairan, J. 1729. Histoire de l'Academie Royal des Sciences, Paris p. 35.
- Maksimov, N. 1924. Proc. Appl. Bot. and Plant Breeding 14, 5–.
- Mansfield, T. and Heath, O. 1961. Studies in stomatal behaviour. X. An investigation of responses to low intensity illumination and temperature in Xanthium pennsylvanicum. J. exp. Bot. 15, 114–124.
- Marchant, E. and Mistlberger, R. 1997. Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Res.* 765, 273–282.

- Marcovic, P., Roenneberg, T. and Morse, D. 1996. Phased protein synthesis at several circadian times does not change protein levels in Gonyaulax. J. Biol. Rhythms 11, 57–67.
- Marcovitch, S. 1924. The migration of the Aphididae and the appearance of the sexual forms as influenced by the relative length of daily light exposure. J. agric. Research **27**, 513–522.

Marimuthu n.d.. unpublished.

- Martin, C., Vernay, R. and Paynot, N. 1982. PPhysiologie vegetale. Photoperiodisme, tuberization, floraison et phenolamides. C. R. Hebd. Seance Acad. Sci. 295, 565–568.
- Martin, E. and Meidner, H. 1971. Endogenous stomatal movements in Tradescantia virginiana. New Phytol. 70, 923–928.
- Martin, S., Epperson, E. and Breukelen, F.: 2000. Quantitative and qualitative changes in gene expression during hibernation in golden-mantled ground squirrels. in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), Life in the cold. Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 315–324.
- Martin, W. and Brinkmann, K. 1976a. A computer program system for the analysis of equispaced time series. J. Interdisc. Cycle Res. 7, 251–258.
- Martin, W. and Brinkmann, K. 1976b. Detection and measurement of periodicities in time series. *Intern. J. Chronobiology* 4, 185–195.
- Martin, W., Kipry, U. and Brinkmann, K. 1977. Timesdia-Ein interaktives Programm zur Analyse periodischer Zeitreihen. *EDV in Medizin und Biologie* 3, 90–94.
- Martinez-Zapater, J., Coupland, G., Dean, C. and Koorneef, M.: 1998. The transition

to flowering in Arabidopsis. *in* C. Somerville and E. Meyerowitz (eds), *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. pp. 403–433.

- Masaki, S. 1980. Summer diapause. Annual Review of Entomology 25, 1–25.
- Masson-Pevet, M., Naimi, F., Canguilhem, B., Saboureau, M., Bonn, D. and Pevet, P. 1994. Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (Cricetus cricetus) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock?. Journal of Pineal Research 17, 151–63.
- Matile, P. and Altenburger, R. 1988. Rhythms of fragrance emission in flowers. *Planta* **174**, 242–247.
- Mattern, D. and Brody, S. 1979. Circadian rhythm in Neurospora crassa: Effects of unsaturated fatty acids. J Bact 139, 977–983.
- Mattern, D., Forman, L. and Brody, S. 1982. Circadian rhythms in Neurospora crassa: A mutation affecting temperature compensation. PNAS USA 79, 825–829.
- Mattes, A., Witte, K., Hohmann, W. and Lemmer, B. 1991. Pharmfit - a nonlinear fitting program for pharmacology. *Chronobiol. In*ternat. 9, 460–476.
- Maurer, A. and Engelmann, W. 1974. Effect of D2O on the circadian rhythm of petal movement of Kalanchoe.. Z. Naturforsch. 29c, 36-38.
- Mayeda, A., Hofstetter, J., Belknap, J. and Nurnberger, J. 1996. Hypothetical quantitative trait loci (QTL) for circadian period of locomotor activity in CXB recombinant inbred strains of mice. *Beh. Genet.* 26, 505–511.

- Mayer, W. 1966. Besonderheiten der circadianen Rhythmik bei Pflanzen verschiedener geografischer Breiten. *Planta* 58, 199–219.
- Mayer, W., Moser, I. and Bünning, E. 1973. Die Epidermis als Ort der Lichtperzeption für circadiane Laubblattbewegungen und photoperiodische Induktionen. Zeitschr. Pflanzenphysiologie 70, 66–73.
- McClure, F.: 1966. *The bamboos.*. Harvard Univ.Press.

McDaniel, C. and et al. 1996.

- McKechnie, A. and Lovegrove, B.: 2000. Heterothermy in mousebirds: Evidence of avian proto-torpor?. in G. Heldmaier and M. Klingenspor (eds), Life in the cold. Springer Berlin, Heidelberg, New York etc.. pp. 49–56.
- McMahon, D. and Block, G. 1987. The Bulla ocular circadian pacemaker: I. Pacemaker neuron membrane potential controls phase through a calcium-dependent mechanism. Journal of Comparative Physiology 161A, 335–346.
- Meenal, A., Mathur, V. and Rajan, R. 1994. Role of light during incubation of silkworm eggs and its effect on rearing performance and diapause. *Indian Journal of Sericulture* 33, 139–141.
- Meesters, Y. 1998. Case study: Dawn simulation as maintenance treatment in a nine-yearold patient with seasonal affective disorder. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry 37, 986–988.
- Meesters, Y., Beersma, D., Bouhuys, A. and van den Hoofdakker, R. 1999. Prophylactic treatment of seasonal affective disorder (SAD) by using light visors: Bright white or infrared light?. *Biological Psychiatry* 46, 239–246.

- Meesters, Y., Jansen, J., Beersma, D., Bouhuys, A. and van den Hoofdakker, R. 1995. Light therapy for seasonal affective disorder: The effects of timing. *British Journal of Psychiatry* 166, 607–612.
- Meidner, H. and Mansfield, T. 1965. Stomatal responses to illumination. *Biol. Rev.* 40, 483–509.
- Meidner, H. and Mansfield, T.: 1968. *Physiolo*gy of stomata. McGraw Hill London.

Meier-Koll, A. 1979. 5, 425–440.

Meier-Koll, A. 1992.

- Meier-Koll, A., Hall, U., Hellwig, U., Kott, G. and Meier-Koll, V. 1978. A biological oscillator system and the development of sleepwaking behavior suring early infancy. *Chro*nobiologia 5, 425–440.
- Meierowitz and X 1994. Arabidopsis thaliana was and is genetically studied intensively review.
- Melchers, G. 1956. Die Beteiligung der endonomen Tagesrhythmik am Zustandekommen der photoperiodischen Reaktion der Kurztagpflanze Kalanchoe blossfeldiana. Z. Naturforsch. 11b, 544–548.
- Melin, D. 1975. Croissance et mouvement revolutif des tiges de Periploca graeca L. Z. *Pflanzenphysiol.* 76, 384–399.
- Menaker and Takahashi 1995. Seminars in the Neurosciences 7, 61–70.
- Menaker, M. 1959. Endogenous rhythms of body temperature in hibernating bats. Nature 184, 1251–1252.

Menaker, M. and Underwood 1976.

Menaker, M., Moreira, L. and Tosini, G. 1997. Evolution of circadian organization in vertebrates. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 30, 305–313.

Mendelson 1997.

- Mergenhagen, D. and Schweiger, H. 1974. Circadian rhythmicity: Does intercellular synchronization occur in Acetabularia?. *Plant Science letters* 3, 387–389.
- Mergenhagen, D. and Schweiger, H. 1975a. Circadian rhythm of oxygen evolution in cell fragments of Acetabularia mediterranea. *Exp. cell Research* **92**, 127–130.
- Mergenhagen, D. and Schweiger, H. 1975b. The effect of different inhibitors of transcription and translation of the expression and control of circadian rhythm in individual cells of Acetabularia. *Exp. Cell Res.* **92**, 127–.
- Merrow, M., Brunner, M. and Roenneberg, T. 1999. Assignment of circadian function for the Neurospora clock gene frequency. *Nature* 399, 584–586.
- Merrow, M., Garceau, N. and Dunlap, J. 1997. Dissection of a circadian oscillation into discrete domains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 3877–3882.
- Michel, S.: n.d., personal communication.
- Michel, S., Geusz, M., Zaritsky, J. and Block, G. 1993. Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science* 259, 239–241.
- Michel, S., Khalsa, S. and Block, G. 1992. Phase shifting of the circadian rhythm in the eye of Bulla by inhibition of chloride conductance. *Neuroscience letters* **146**, 219–222.

- Middleton and X n.d.. Even under constant conditions of weak light (8 lux) a group of 6 persons showed free run of body temperature-, activitys- and sleep-wakerhythms, although they knew the times of the day.
- Miles, L., Raynal, D. and Wilson, M. 1977. Blind man living in normal society has circadian rhythms of 24.9 hours. *Science* **198**, 622–633.
- Millar, A.: 1998. The cellular organization of circadian rhythms in plants: Not one but many clocks. *Biological rhythms and photoperi*odism in plants. Environmental Plant Biology. Bios Scientific Publishers Oxford, Washington DC. pp. 51–68.
- Millar, A. 1999. Biological clocks in Arabidopsis thaliana.. New Phytologist 141, 175–197.
- Mills n.d.. From these informations conclusions could be drawn how jet lag can be avoided or reduced. So far there are only a few physiological and biochemical data. These studies could also be performed on the ground.
- Mills, A., Crawford, L., Domjan, M. and Faure, J. 1997. The behavior of the Japanese or domestic quail Coturnix japonica. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **21**, 261– 281.
- Minors, D. and Waterhouse, J.: 1981. *Circadi*an rhythms and the human. Wright. Bristol, London, Boston.
- Mitrakos, K., Bünning, E. and Eberhardt, F. 1957. Endogen-tagesperiodische Schwankungen der Chloroplasten-Farbstoffe. Z. Naturforschung 12b, 813–814.
- Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S. and Arai, T. 1986. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cya-

nobacteria grow photoautotrophically. *Nat.* **323**, 720–722.

- Mitsuno, M. and Sibaoka, T. 1989. Rhythmic electrical potential change of motor pulvinus on lateral leaflet of Codariocalyx motorius.. *Plant Cell Physiol.* **30**, 1123–1127.
- Mittag, M. 1998. Molecular mechanisms of clock-controlled proteins in phytoflagellates. *Protist* 149, 101–107.
- Mohl, H.: 1827. Über den Bau und das Winden der Ranken und Schlingpflanzen.. Tübingen.
- Moore-Ede, M. 1986. Jet lag, shift work, and maladaptation. *NIPS* **1**, 156–160.
- Moore-Ede, M. and Richardson, G. 1985. Medical implications of shift-work. Ann. Rev. Med. 36, 607–617.
- Moore-Ede, M., Sulzman, F. and Fuller, C.: 1982. The clocks that time us. Physiology of the circadian timing system. Harvard University Press, Cambridge, London.
- Moore, R.: 1997. Chemical neuroanatomy of the mammalian circadian system. in P. Redfern and B. Lemmer (eds), *Physiology and Pharmacology of biological rhythms*. Springer. Berlin, Heidelberg, New York. chapter chapter 4, pp. 79–93.
- Moore, R. and Eichler, V. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201–206.
- Moore, R. and Lenn, N. 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. J. Comp. Neurology 146, 1–14.
- Morgan, E., Diez-Noguera, A. and Minors, D. 1992. Methods of rhythm analysis in a biological time-series. *JICR* 23, 199–201.

- Morgan, L. and Feldman, J. 1997. Isolation and characterization of a temperature-sensitive circadian clock mutant in Neurospora crassa. *Genetics* **146**, 525–530.
- Mori, T., Binder, B. and Johnson, C. 1996. Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours.. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 10183–10188.
- Morse, D., Fritz, L. and Hastings, J. 1990. What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence.. *TIBS* **15**, 262– 265.
- Morse, D., Hastings, J. and Roenneberg, T. 1994. Different phase responses of two circadian oscillators in Gonyaulax. J. Biol. Rhythms 9, 263–274.
- Morse, D., Markovic, P. and Roenneberg, T. 1996. Several clocks may simplify the circadian system of Gonyaulax.. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 29, 101– 103.
- Morse, D., Milos, P., Roux, E. and Hastings, J. 1989. Circadian regulation of the synthesis of substrate binding protein in the Gonyaulax bioluminescent system involves translational control. *PNAS* 86, 172–176.
- Moshkov, B. 1936. Role of leaves in photoperiodic reaction of plants. Bull. Appl. Bot. Genet. and Plant Breed. A17, 25.
- Moshkov, B. 1937. Flowering of short day plants in continuous light as a result of grafting. Tr. prikl. Bot., Genet. i Selekts. Ser. A., Sotsialist, Rastenievodsvo 21, 145-.
- Mouret, J., Coindet, J., Debilly, G. and Chouret, G. 1978. Suprachiasmatic nuclei leasions in the rat: alterations in sleep circadian

rhythms. Electroencephalograph. Clin. Neurophysiol. 45, 402–408.

- Mrosovsky, N. 1988. Phase response curves for social entrainment. J. Comp. Physiology A126, 35–46.
- Mrosowsky, N. 1980. Circannual cycles in golden-mantled ground squirrels: Experiments with food deprivation and effects of temperature on periodicity. J. Comp. Physiol. 136A, 355–360.

Mrosowsky, N. 1994. masking.

- Mrosowsky, N. and Salmon, P. 1987. A behavioral method for accelerating re-entrainment of rhythms to new light-dark cycles. *Nature* 330, 372–373.
- Müller-Haeckel, A. 1975. Endogene Jahresrhythmik der Blattbewegungenzweier Oxalis-Arten.. *Physiol. Plant* **35**, 236–242.
- Munoz, V., Brody, S. and Butler, W. 1974. Photoreceptor pigment for blue light responses in Neurospora crassa. *Biochem. Biophys. Res. Communication* 58, 322–327.
- Murray, D., Roller, S., Kuriyama, H. and Lloyd, D. 2001. Clock control of ultradian respiratoryx oscillation found during yeast continuous culture. J. Bacteriol. 183, 7253– 7259.
- Murray, J.: 1993. in J. Murray (ed.), Mathematical Biology. Springer, Berlin. p. 143.

Naitoh n.d.

- Nakagaki, M., Takei, R., Nagashima, E. and Yaginuma, T. 1991. Cell cycles in embryos of the silkworm, Bombyx mori: G-2-arrest at diapause stage. *Roux's Archives of Developmental Biology* **200**, 223–229.
- Nakamura, H., Kishi, Y., Shimomura, O., Morse, D. and Hastings, J. 1989. Structure

of dinoflagellate luciferin and its enzymatic and non-enzymatic air-oxidation products. J. Am. Chem. Soc. **111**, 7607–7611.

- Nakao, M., McGinty, D., Szymusiak, R. and Yamamoto, M. 1999. Thermoregulatory model of sleep control: Losing the heat memory. *JBR* 14, 547–556.
- Nakashima, H.: 1985. Biochemical and genetical aspects of the conidiation rhythm in Neurospora crassa: Phase shifting by metabolic inhibitors. in T. Hiroshige and K. Honma (eds), Circadian clocks and Zeitgebers. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan. pp. 33–44.
- Nakashima, H. 1986. Phase shifting of the circadian conidiation rhythm in Neurospora crassa by calmodulin antagonists. J. Biol. Rhythms 1, 163–169.
- Nakashima, H. and Onai, K. 1996. The circadian conidiation rhythm in Neurospora crassa. Semin. Cell Developm. Biol. 7, 765–774.
- Nakashima, H., Perlman, J. and Feldman, J. 1981. Genetic evidence that protein synthesis is required for the circadian clock of Neurospora. *Science* 212, 361–362.
- Nalborczyk, E., LaCroix, L. and Hill, R. 1975. Can. J. Bot. 53, 1132–1138.
- Nanjundiah, V. 1987. Periodic stimuli are more successful than randomly spaced ones for inducing development in Dictyostelium discoideum.. *Biosc. Rep.* 8, 571–577.
- Napp-Zinn, K.: 1969. Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.. in L. Evans (ed.), The induction of flowering. Macmillan of Australia, South Melbourne. pp. 291–304.
- Naylor, E. 1963. Temperature relationships of the locomotor rhythm of Carcinus. J. exp. Biology 40, 669–679.

- Neff, R., Blasius, B., Beck, F. and Lüttge, U. 1998. Thermodynamics and energetics of the tonoplast membrane operating as a hysteresis switch in an oscillatory model of Crassulacean acid metabolism. J. Membrane Biol.
- Nelson, R. 1990. Photoperiodic responsiveness in house mice. Physiology and Behavior **48**, 403–408.
- Nelson, R. and Blom, J. 1994. Photoperiodic Effects on Tumor Development and Immune Function. Journal of Biological Rhythms 9, 233-249.
- Nelson, R. and X 1997. photoperiodic time cues (for instance Peromyscus maniculatus.
- Nemeroff, C. 1998. The neurobiology of depression. Scientific American 278(July), 28-35.
- Neugebauer, A.: 1997. Duftrhythmen ausgewählter Blütenpflanzen. Master's thesis. Universität Tübingen.
- Neugebauer, A.: 2002. Dreidimensionale Registrierung circadianer und ultradianer Wachstumsvorgänge des Hypokotyls von Arabidopsis thaliana und Cardaminopsis arenosa. PhD thesis. Universität Tübingen, Germany.
- Neumann 1973. Semilunar periodic reproduction of Clunio marinus - biological time measurement.. Film C1091 IWF Göttingen.
- Neumann, D. 1966. Die lunare und tägliche Schlüpfperiodik der Mücke Clunio. Steuerung und Abstimmung auf die Gezeitenperiodik. Z. vergleichende Physiologie 53, 1-61.
- Neumann, D. 1976. Mechanismen für die zeitliche Anpassung von Verhaltens- und Entwicklungsleistungen an den Gezeitenzyklus. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1976, 9–28.
- Neumann, D.: 1981. Tidal and lunar rhythms. in J. Aschoff (ed.), Handbook of behavioral Newell 1979.

neurobiology. Vol. 4. Plenum Press, New York, London. pp. 351-380.

- Neumann, D. 1983. Die zeitliche Programmierung von Tieren auf periodische Umweltbe-Rhein. Westf. Akad. Wiss. Vortr. dingungen.. N324, 31-68.
- Neumann, D.: 1988. The timing of reproduction to distinct spring tide situations in the intertidal insect Clunio. in G. Chelazzi and M. Vannini (eds), Behavioral adaptation to intertidal life. Vol. 151 of A: Life Sciences. NATO ASI.
- Neumeister, A., Praschak-Rieder, N., Hesselmann, B., Rao, M., Glueck, J. and Kasper, S. 1997. Effects of tryptophan depletion on drug-free patients with seasonal affective disorder during a stable response to bright light therapy. Archives of General Psychiatry 54, 133–138.
- Neumeister, A., Turner, E., Matthews, J., Postolache, T., Barnett, R., Rauh, M., Vetticad, R., Kasper, S. and Rosenthal, N. 1998. Effects of tryptophan depletion vs catecholamine depletion in patients with seasonal affective disorder in remission with light therapy. Archives of General Psychiatry 55, 524-530.
- Neville, A. 1965. Rhythmic chitin deposition was found also in a Höhlenlaubheuschrecke Dolichopoda hinderi in continuous darkness.
- Neville, A.: 1975. Biology of the arthropod cuticle. Springer, New York.
- Newby, L. and Jackson, F. 1991. Drosophila ebony mutants have altered circadian activity rhythms but normal eclosion rhythms. J. Neurogenetics 7, 85–101.

- suprachiasmatic nucleus 2-deoxyglucose uptake in vitro. Brain Res. 381, 345-350.
- Nicol, S. and Andersen, N.: 2000. Patterns of hibernation of Echidnas in Tasmania. in G. Heldmaier and M. Klingenspor (eds), Life in the cold. Springer Berlin, Heidelberg, New York etc., pp. 21–28.
- Nicolas, M., Johnsson, C., Bassot, J. and Hastings, J. 1985. Immunogold labeling of organelles in the bioluminescent dinoflagellate Gonyaulax polyedra with anti-liciferase antibody.. Cell Biol. Int. Rep. 9, 797-802.
- Nicolau, M., Akaarir, M., Gamundi, A., Gonzalez, J. and Rial, R. 2000. Why we sleep: the evolutionary pathway to the mammalian sleep. Progress in Neurobiology 62, 379–406.
- Nimmo, G., Nimmo, H., Hamilton, I., Fewson, C. and Wilkins, M. 1986. Purification of the phosphorylated night form and dephosphorylated day form of phosphoenolpyruvate carboxylase in Bryophyllum leaves: A possible covalent modification. Biochem. J. 239, 213-220.
- Nimmo, G., Wilkins, M., Fewson, C. and Nimmo, H. 1987. Persistant circadian rhythms in the phosphorylation state of phenolpyruvate carboxylase fromBryophyllum fedtschenkoi leaves and its sensitivity to inhibition by malate. Planta 170, 408-415.
- Ninnemann, H. 1979. Photoreceptors for circadian rhythms. Photochem. Photobiol. Rev. 4, 207-266.
- Ninnemann, H.: 1984. The nitrate reductase system. in H. Senger (ed.), Blue light effects in biological systems. Springer Berlin. pp. 95xx.

- Newman, G. and Hospod, F. 1986. Rhythm of Nisimura, T. and Numata, H. 2001. Endogenous timing mechanism controlling the circannual pupation rhythm of the varied carpet beetle Anthrenus verbasci. J. Comparative Physiology A187, 433–440.
  - Nitsch, J. 1966. Photoperiodisme et tuberisation. Bull. Soc. fr. Physiol. veq. 12, 233-246.
  - Njus, D., Gooch, D. and Hastings, J. 1981. Precision of the Gonyaulax circadian clock.. Cell Biophys. 3, 223–231.
  - Njus, D., Sulzman, F. and Hastings, J. 1974. Membrane model for the circadian clock. Nature 248, 116–120.

Nobel 1996.

- Nultsch, W., Rüffer, U. and Pfau, J. 1984. Circadian rhythms in the chromatophore movements of Dictyota dichotoma. Marine Biology 81, 217-222.
- Numata, H., Shiga, S. and Morita, A. 1997. Photoperiodic receptors in arthropods. Zool.Sc. 14, 187–197.
- Nürnberger, F., Zhang, Q. and Pleschka, K.: 2000. Neuropeptides and neurotransmitters in the suprachiasmatic nucleus: Relationship with the hibernation process. in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), *Life in the cold*. Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 261-267.
- Oehmke, M. 1973. Lunar periodicity in flight activity of honey bees. J. interdisc. Cycle Res. 4, 319–335.
- Ogawa, Y. and Zeevaart, J.: 1967. The relation of growth regulators to flowering. Physiology of flowering in Pharbitis nil. Jap. Soc. Plant Physiol. Tokyo. pp. 107-119.

- Ohata, K., Nishiyama, H. and Tsukahara, Y.: 1998. Action spectrum of the circadian clock photoreceptor in Drosophila melanogaster. in Y. Touitou (ed.), Biological clocks: Mechanisms and applications. Elsevier. Amsterdam. pp. 167–171.
- Oka, H. and Hashimoto, H. 1959. Lunare Periodizität in der Fortpflanzung einer pazifischen Art von Clunio (Diptera, Chironomidae). *Biol. Zentralblatt* **78**, 545–559.
- Okamuro, J., Den Boer, B. and Jofuku, K. 1993. Regulation of arabidopsis flower development. *Plant Cell* 5, 1183–1193.
- Oklejewicz, M., Daan, S. and Strijkstra, A. 2001. Temporal organisation of hibernation in wild-type and tau mutant Syrian hamsters. *Comp. Physiol.* B 171, 431–439.
- Okuda, M. 1953. Flower formation of Xanthium canadense under long-day conditions induced by grafting with long day plants. *Bot. Mag. Tokyo* 66, 247–255.
- Oliver, J. and Bayle, J. 1982. Brain photoreceptors for the photoinduced testicular response in birds. *Experientia* **38**, 1021–1029.
- Olson and Jacklet 1985 1985. various ganglionic connectives throughout the CNS.
- Olson, L. and Jacklet, J. 1985. The circadian pacemaker in the Aplysia eye sends axons throughout the central nervous system. J. Neurosci. 5, 3214–3227.
- Oltmanns, O. 1960. Über den Einfluss der Temperatur auf die endogene Tagesrhythmik und die Blühinduktion bei der Kurztagpflanze Kalanchoe blossfeldiana. *Planta* 54, 233– 264.
- Onai, K., Katagiri, S., Akiyama, M. and Nakashima, H. 1998. Mutation of the gene for

the second largest subunit of the RNA polymerase I prolongs the period length of the circadian conidiation rhythm in Neurospora crassa. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 264–271.

- Oren 1996. As the photoreceptor the authors suggested hem-compounds such as hemoglobin or bilirubin.
- Oren, D. 1997. Bilirubin, REM sleep, and phototransduction of environmental time cues. A hypothesis. *Chronobiology International* 14, 319–329.

Ortega 1991.

Osmond, C. 1978. Crassulacean acid metabolism: A curiosity in context.. ARPP 29, 379– 414.

Oswald 1978. Humoral sleep hypothesis.

- Ottenweller, J., Meier, A., Russo, A. and Frenzke, M. n.d.. Circadian rhythms of plasma corticosterone binding activity in the rat and the mouse. Acta Endocrin. (Copenh.) 91, 150–157.
- Ouarour, A., Cutrera, R. and Pevet, P. 1995. Effects of 5-HT denervation of the suprachiasmatic nuclei or lesions of the median raphe nucleus on daily torpor in the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Biological Signals* 4, 51–58.
- Ouarour, A., Kirsch, R. and Pevet, P. 1991. Effects of temperature, steroids and castration on daily torpor in the Djungarian hamster (Phodopus sungarus). J. Comp. Physiol. 168A, 477–481.
- Overland, L. 1960. Endogogenous rhythm in opening and odor of flowers of Cestrum nocturnum.. Am. J. Bot. 47, 378–382.
- Page, T. and Larimer, J. 1975. Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish II.

The ERG-amplitude rhythm. J. comp. Physiol. 97, 81–96.

- Page, T. and Nalovic, K. 1992. Properties of mutual coupling between the two circadian pacemakers in the eyes of the mollusc Bulla gouldiana. *Journal of Biological Rhythms* 7, 213–226.
- Paietta, J. and Sargent, M. 1981. Photoreception in Neurospora crassa: Correlation of reduced light sensitivity with flavin deficiency. *PNAS USA* 78, 5573–5577.
- Paietta, J. and Sargent, M. 1983. Modification of blue light photoreceptor in the photoinduction of protoperithecia in Neurospora crassa. *Plant Physiology* 72, 764–766.
- Palevitz, B.: 1981. The structure and development of guard cells. in P. Jarvis and T. Mansfield (eds), Stomatal physiology. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1–23.
- Pallas, J., Samish, Y. and Willmer, C. 1974. Endogenous rhythmic activity of photosynthesis, transpiration, dark respiration, and carbon dioxide compensation point of peanut leaves. *Plant Physiol.* 53, 907–911.
- Palmer, J.: 1974. Biological clocks in marine organisms: The control of physiological and behavioral tidal rhythms.. Wiley Interscience New York, London, Sydney, Toronto.
- Palmer, J.: 1976. Clock-controlled vertical migration rhythms in intertidal organisms. in P. DeCoursey (ed.), Biological rhythms in the marine environment. University of South Carolina University Press, South Carolina. pp. 239–255.
- Palmer, J.: 1995. Biological clocks in marine organisms: The control of physiological and behavioral tidal rhythms. Wiley Interscience Publ. NY.

- Palmer, J. and Round, F. 1967. Persistent, vertical-migration rhythms in benthic microflora. VI. The effect of light and temperature on the rhythmic behaviour of Euglena obtusa. J. Mar. Biol. Ass. UK 45, 567–582.
- Pannella, G., McClintock, C. and Thompson, M. 1968. Palaeontological evidence of variations in length of synodic month since late cambrian. *Science* 162, 792–796.
- Papi, F. 1955. Experiments on the sense of time in Talitrus saltator (Montagu)(Crustacea Amphipoda). *Experientia* **11**, 201–202.
- Papi, F. 1960. Orientation by night: The moon. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 25, 475–480.
- Papi, F. and Pardi, L. 1953. Ricerche sull'orientamento di Talitrus saltator (Montagu) (Crustacea Amphipoda) II. Z. vergl. Physiologie 35, 490–518.
- Pardi and Scapini: 1987. Die Orientierung der Strandflohkrebse im Grenzbereich Meer/Land. Fischer Verlag Stuttgart, New York.
- Pardi, L. and Papi, F. 1952. Die Sonne als Kompass bei Talitrus saltator Montagu (Amphipoda Talitridae). Naturwiss. 39, 262–263.
- Paris, O. and Jenner, C.: 1959. Photoperiodic control of diapause in the pitcher plant midge, Metriocnemus knabi. in R. Withrow (ed.), Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. American Association for the advancement of Science, Washington D.C.. pp. 601–624.
- Partonen, T. and Lonnqvist, J. 1996. Prevention of winter seasonal affective disorder by bright-light treatment.. *Psychological Medicine* 26, 1075–80.

- mathematical analysis.. cad. Press New York, London.
- Pavlidis, T. and Kauzman, W. 1969. Toward a quantitative biochemical model for circadian oscillators. Arch. Biochem. Biophys. 132, 338-348.
- Pearse, J.: 1990. Lunar reproductive rhythms in marine invertebrates: Maximizing fertilization?. in M. Hoshi and O. Yamashita (eds), Advances in invertebrate reproduction. Elsevier, Oxford, UK. pp. 311-316.
- Peixoto, A., Hennesey, J., Townson, I., Hasan, G., Rosbash, M., Costa, R. and Kyriacou, C. 1998. Molecular coevolution within a Drosophila clock gene. Proc. Nat. Acad. Sciences US 95, 4475-4480.
- Pengelley, E. and Asmundson, S.: 1974. Circannual rhythmicity in hibernating mammals.. in E. Pengelley (ed.), *Circannual clocks*. Academic Press, New York. pp. 95–160.
- Pengelley, E. and Fisher, K. 1963. The effect of temperature and photoperiod on the yearly hibernating behavior of captive goldenmantled ground squirrrls (Citellus lateralis tescorum).. Can. J. Zool. 41, 1103–1120.
- Pengelley, E., Asmundson, S., Barnes, B. and Aloia, R. 1976. Relationship of light intensity and photoperiod to circannual rhythmicity in the hibernating ground squirrel, Citellus lateralis. Comp. Biochem. Physiol. 53A, 273–277.

Perkins 1992.

Perlmann, J., Nakashima, H. and Feldman, J. 1981. Assay and characteristics of circadian rhythmicity in liquid cultures of Neurospora crassa. Plant Physiol. 67, 404-407.

- Pavlidis, T.: 1973. Biological oscillators: Their Perrigo, G., Belvin, L. and vom Saal, F. 1992. Time and sex in the male mouse: Temporal regulation of infanticide and parental behavior. Chronobiology Interntional 9, 421–433.
  - Pesti, J. 1976. Daily fluctuations in the sugar content of nectar and periodicity of secretion in the Compositae. Acta Agron. Acad. Hung. **25**, 5–27.

Pfaff 1980.

- Pickard, B. and Ding, J. 1993. The mechanosensory calcium-selective ion channel: Key component of a plasmalemmal control centre?. Austr. J. Plant Physiol. 20, 439-459.
- Pickard, G. 1994. Intergeniculate leaflet ablation alters circadian rhythms in the mouse. Neuroreport 5, 2186–2188.

Pickard, G. and X 1995. xx: tau mutant mouse.

- Pieron, H.: 1913. Le probleme physiologique du sommeil. Paris, Masson.
- Pittendrigh, C. 1954. On temperature independence in the clock system controlling emergency time in Drosophila. PNAS 40, 1018-1029.
- Pittendrigh, C. 1964. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. American Naturalist **98**, 261–294.
- Pittendrigh, C.: 1965. On the mechanism of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. in J. Aschoff (ed.), Circadian clocks. North-Holland Publishing Co.. Amsterdam. pp. 277-297.
- Pittendrigh, C. 1966. The circadian oscillation in Drosophila pseudoobscura: a model for the photoperiodic clock. Z.Pflanzenphysiol. **54**, 275–307.

- Pittendrigh, C.: 1981. Circadian organization and the photoperiodic phenomena. *in* Follet and Follet (eds), *Biol. clocks in seasonal reproductive cycles*. Wright and sons, Ltd. Bristol. pp. 1–35.
- Pittendrigh, C. and Daan, S. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *Journal of Comparative Physiology* **106**, 333–355.
- Pittendrigh, C. and Minis, D. 1972. Circadian systems: Longevity as a function of circadian resonance in Drosophila melanogaster.. Proc.Nat.Acad.Science (USA) 69, 1537– 1539.
- Pittendrigh, C. and Takamura, T. 1987. Temperature dependence and evolutionary adjustment of critical night length in insect photoperiodism. *PNAS US* 84, 7169–7173.
- Plautz, J., Kaneko, M., Hall, J. and Kay, S. 1997. Independent photoreceptive circadian clocks throughout Drosophila. *Science* 278, 1632–1635.
- Pochobradsky, J. 1974. Independence of human menstruation on lunar phases and days of the week. Am. J. Obstet. Gynecol. 118, 1136– 1138.
- Pöggeler, B., Balzer, Hardeland, R. and Lerchl, A. 1991. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate Gonyaulax polyedra. *Naturwiss.* **78**, 268–269.
- Pöggeler, B., Balzer, I., Fischer, J., Behrmann, G. and Hardeland, R. 1989. A role of melatonin in dinoflagellates?. Acta Endocrinol. 120 (Suppl.), 97–113.
- Pohl, H. and Giedke, H. 1987. Natural hibernation - an animal model for seasonal affective disorder?. J. therm. Biol. 12, 125–130.

Possidente, B. and X 1990.

- Possidente, B. and X 1992. Serotonin seems to affect period length of the circadian clock.
- Possidente, B., McEldowney, S. and Pabon, A. 1995. Aging lengthens circadian period for wheel-running activity in C57BL mice. *Phy*siology & Behavior 57, 575–579.
- Powers, M., Barlow, R. and Kass, L. 1991. VI-SUAL PERFORMANCE OF HORSESHOE CRABS DAY AND NIGHT. Visual Neuroscience 7, 179–190.
- Press, W., Flannery, B., Teukolsky, S. and Vetterling, W.: 1989. Numerical recipies. The art of scientific computing. Cambridge University Press, Cambridge.
- Preti, G., Cutler, B., Garcia, C., Huggins, G. and Lawley, H. 1986. Human axillary secretions influence women's menstrual cycles: The role of donor extract of females. *Horm. and Beh.* 20, 474–482.
- Price, J., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B. and Young, M. 1998. doubletime is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation.. *Cell* 94, 83–95.
- Price, J., Dembinska, M., Young, M. and Rosbash, M. 1995. Supression of PERIOD protein abundance and circadian cycling by the Drosophila clock mutation timeless. *EMBO* J. 14, 4044–4049.

Prichard 1981.

- Prosser, R. and Gillette, M. 1989. The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP. J. Neurosci. 9, 1073–1081.
- Prosser, R., Dean, R., Edgar, D., Heller, H. and Miller, J. 1993. Serotonin and the mammalian circadian system: I. In vitro phase shift

by serotonic agonists and antagonists. J. Biol. Rhythms 8, 1–16.

- Provencio, I. and Foster, R. 1995. Circadian rhythms in mice can be regulated by photoreceptors with cone-like characteristics. *Brain Research* 694, 183–190.
- Provencio, I. and X 1998. So far unknown retinal photopigments were discovered in amphibian.
- Provencio, I., Wong, S., Lederman, A., Argamaso, S. and Foster, R. 1994. Visual and circadian responses to light in aged retinally degenerate mice. *Vision Research* 34, 1799– 1806.
- Psarev, G. 1936. Localization of the photoperiodic stimulus in soybean. Sovetsk Bot. 1936(3), 88.
- Puchalski, W. and Lynch, G. 1994. Photoperiodic time measurement in Djungarian hamster evaluated from temperature cycle studies. *Am. J. Physiology* 267, R191–201.
- Putterill, J. 2001. Flowering in time: Genes controlling flowering in Arabidopsis. *Philosoph. Transact. Royqal Soc, London* B356, 1761–1767.
- Qiu, J. and Hardin, P. 1996. per mRNA cycling is locked to lights-off under photoperiodic conditions that support circadian feedback loop function. *Molec. Cell. Biol.* 16, 4182– 4188.
- Quadagno, D., Shubeita, H., Deck, J. and Francoeur, D. 1981. Influence of male social contacts, exercise and all-female living conditions on the menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology* 6, 239–244.
- Quail, P. 1997. An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell and Environment* 20, 657–665.

- Quail, P., Boylan, M., Parks, D., Short, T., Xu, Y. and Wagner, D. 1995. Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. *Science* 268, 675–680.
- Queiroz, O. 1974. Circadian rhythms and metabolic patterns. Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 115–134.
- R, M. and W. 1997. flowering time-genes.
- Raju, U., Koumenis, C., Nunez-Regueiro, M. and Eskin, A. 1991. Alteration of the phase and period of a circadian oscillator by a reversible transcription inhibitor. *Science* 253, 673–675.
- Raju, U., Nunez-Regueiro, M., Cook, R., Kaetzel, M., Yeung, S. and Eskin, A. 1993. Identification of an annexin-like protein and its possible role in the Aplysia eye circadian system. J. Neurochem. 61, 1236–1245.
- Ralph, M. and Block, G. 1990. Circadian and light-induced conductance changes in putative pacemaker cells of Bulla gouldiana. *Jour*nal of Comparative Physiology 166A, 589– 596.
- Ralph, M. and et al 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978.
- Ralph, M. and Menaker, M. 1988. A mutation of the circadian system in golden hamster. *Science* 241, 1225–1227.
- Ralph, M., Joysner, A. and Lehman, M. 1993. Culture and transplantation of the mammalian circadian pacemaker. Journal of Biological Rhythms 8, S83–S87.
- Ramalho, C., Hastings, J. and Colepicolo, P. 1995. Circadian oscillation of nitrate reductase activity in Gonyaulax polyedra is due to changes in cellular protein levels.. *Plant Physiology* **107**, 225–231.

- Rapp 1979. An atlas of biological Oscillations. J. exp. Biology 81, 281.
- Rappe, G. 1964. A yearly rhythm in production capacity of gramineous plants B I. Experiments in photothermostats on artificial seedbeds. *Oikos* 15:I, 140–161.
- Raschke, K. 1976. How stomata resolve the dilemma of opposing priorities. *Phil. Trans. R. Soc. London* B273, 551–560.
- Razumov, V. 1931. On the localization of photoperiodical stimulation. Bull. Appl. Bot. Gen. Plant Breed. 27, 249.
- Redman, J., Lewy, A. and Sack, R. 1997. Circadian entrainment and phase shift in mammals with melatonin. J. Biol. Rhythms 12, 581–587.
- Reed, J., Nagatani, A., Elich, T., Fagan, M. and Chory, J. 1994. Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distible functions in Arabidopsis development. *Plant Physiol.* **104**, 1139–1149.
- Refinetti, R. 1991. An extremely simple procedure for the analysis of circadian and estrous periodicity. *Physiology and Behavior* 50, 655–659.
- Refinetti, R. 1993. A functional model of the mammalian circadian pacemaker. Int. J. Biomed. Comp. 32, 45–60.
- Refinetti, R. 1997. Homeostasis and circadian rhythmicity in the control of body temperature. Ann-N-Y-Acad-Sci. 1997 Mar 15, 81363–70.
- Refinetti, R. and Menaker, M. 1991. The circadian rhythm of body temperature. *Physiol. Beh.* 51, 613–637.
- Refinetti, R., Kaufman, C. and Menaker, M. 1994. Complete suprachiasmatic lesions eli-

minate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters. J. Comp. Physiol. **175**, 223–232.

- Reid, M., Nishino, S., Tafti, M., Siegel, J., Dement, W. and Mignot, E. 1998. Neuropharmacological characterization of basal forebrain cholinergic stimulated cataplexy in narcoleptic canines. *Exp. Neurol.* **151**, 89– 104.
- Reimers, F. 1957. The effects of photoperiod on the growth and formation of garlic and onion bulbs. *Fiziol. Rast.* 4, 463–469.
- Reinberg: 1974. Chronopharmacology in man. Chronobiological aspects of endocrinology. Vol. 9. Symp. Medica Hoechst.
- Reinberg, A. and Sidi, E. 1966. Circadian changes in the inhibitory effects of an antihistaminic drug in man. J. Invest. Dermat.
- Reinberg, A., Vieux, N., Ghata, J., Chaumont, A. and Laporte, A. 1978. Circadian rhythm amplitude and individual ability to adjust to shift work. *Ergonomics* 21, 763–766.
- Reinberg and Smolensky: 1983. Biological Rhythms and Medicine: Cellular, metabolic, physiopathologic, and pharmacological aspects. Springer Berlin.
- Reis, P. 1992. Variations in the strength of wool fibres: A review. Australian J. Agricultural Research 43, 1337–1351.
- Reiter 1997. Melatonin reduces this stress in different ways.
- Reme, C., Wirz-Justice, A. and Terman, M. 1991. The visual input stage of the mammalian circadian pacemaker system: I. Is there a clock in the mammalian eye?. J. Biol. Rhythms 6, 5–29.

- Rensing, L.: 1993. Oscillations and morphogenesis. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong.
- Rensing, L.: 1996. Molecular biology of circadian clocks. in B. Lemmer (ed.), From the biological clock to chronopharmacology. Medpharm Scientific Publishers Stuttgart. pp. 9– 22.
- Rensing, L. and Schill, W.: 1987. Perturbation by single and double pulses as analytical tool for analysing oscillatory mechanisms.. in L. Rensing, U. an der Heyden and M. Mackey (eds), Temporal disorder in human oscillatory systems. Springer, Heidelberg.
- Rensing, L., Meyer-Grahle, U. and Ruoff, P. 2001. Biological timing and the clock metaphor: Oscillatory and hourglass mechanisms. *Chronobiology International* 18, 329–369.
- Rentschler, H. 1967. Photoperiodische Induktion der Monosporenbildung bei Porphyra tenera Kjellm. (Rhodophyta - Bangiophyceae). (Rhodophyta - Bangiophyceae).. Planta 76, 65–74.
- Reppert, S.: 1995. Interactions between the circadian clocks of mother and fetus.. in D. Chadwick and K. Ackrill (eds), *Circadi*an clocks and their adjustments. CIBA foundation Symposium. Wiley, Chichester, UK. pp. 198–211.
- Reppert, S. and Schwartz, W. 1983. Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science* 220, 969–971.
- Reppert, S. and Weaver, D. 2000. Comparing clockworks: Mouse versus fly. *Journal of Biological Rhythms* 15, 357–364.
- Richardson, G. and Malin, H. 1996. Circadian rhythm sleep disorders: Pathophysiology and treatment. *Journal of Clinical Neurophysio*logy 13, 17–31.

- Richter and Ross 1981. gained energy during glycolysis-oscillations of yeast is increased.
- Richter, C.: 1965. Biological clocks in medicine and psychiatry.. Thomas W. Salmon Lectures, delivered in New York City, 1959. Charles C. Thomas Publ. Springfield, Ill.
- Richter, C. 1967. Sleep and activity: Their relation to the 24-hour clock. Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. 45, 8–27.

Ricqles, A. n.d.

- Rieger, D.: 2002. Einfluss verschiedener Photrezeptoren auf das Aktivitätsmuster von Drosophila melanogaster im Kurz- und Langtag. Diplomarbeit. Universität Tübingen.
- Rijn, J. and Shilo, M. 1985. Limn. Oceanogr. 30, 1219–1228.
- Roberts, M. and Block, G. 1983. Mutual coupling between the ocular circadian pacemakers of Bulla gouldiana. *Science* 221, 87–89.
- Roberts, M. and Moore, R. 1987. Localization of neuropeptides in efferent terminals of the eye in the marine snail, Bulla gouldiana. *Cell. Tissue. Res.* 248, 67–73.
- Roberts, M., Towles, J. and Leader, N, K. 1992. Tyrosin kinase regulation of a molluscan circadian clock. *Brain Research* 592, 170–174.
- Robinson, E. and Fuller, C. 1999. Endogenous thermoregulatory rhythms of squirrel monkeys in thermoneutrality and cold. Am. J. Physiology 276, 1397–1407.
- Roeder, P., Forman, L. and Brody, S. 1977. Unsaturated fatty acid oscillations in Neurospora: A role in the circadian clock?. J. Cell Biology 75, 215a.
- Roelofsen, P. 1965. Ultrastructure of the wall in growing cell and its relation to the direction of growth.. Adv. Bot. Res. 2, 69–149.

- rhythm of human reproduction: I. Biology, sociology, or both?. J.Biol. Rhythms 5, 195-216.
- Roenneberg, T. and Aschoff, J. 1990b. Annual rhythm of human reproduction: II. Environmental correlations. J.Biol. Rhythms 5, 217-239.

Roenneberg, T. and et al. 1993.

- Roenneberg, T. and Foster, R. 1997. Twilight times: light and the circadian system.. Photochemistry & Photobiology 66, 549–61.
- Roenneberg, T. and Hastings, J. 1988. Two photoreceptors control the circadian clock of a unicellular alga. Naturwiss. 75, 206-207.
- Roenneberg, T. and Merrow, M. 1998. Moelcular circadian oscillators: An alternative hypothesis. JBR 13, 167–179.
- Roenneberg, T. and Merrow, M. 1999. Circadian systems and metabolism. J. Biological Rhythms 14, 449–459.
- Roenneberg, T. and Merrow, M. 2001. Seasonality and photoperiodism in fungi. Journal of Biological Rhythms 16, 403–414.
- Roenneberg, T. and Morse, D. 1993. Two circadian oscillators in one cell. Nature 362, 362-364.
- Roenneberg, T. and Rehman, J.: 1998. Survival in a temporal world - the circadian program of the marine unicell Gonyaulax. in M. Chaddick, S. Baumberg, D. Hodgson and M. Phillips-Jones (eds), Microbial Responses to Light and Time. University Press Cambridge.. pp. 237–250.
- Roenneberg, T. and Taylor, W. 1994. Lightinduced phase responses in Gonyaulax are drastically altered by creatine. Journal of Biological Rhythms 9, 1–12.

- Roenneberg, T. and Aschoff, J. 1990a. Annual Roenneberg, T., Colfax, G. and Hastings, J. 1989. A circadian rhythm of population behavior in Gonyaulax polyedra. JBR 4, 201– 216.
  - Roenneberg, T., Nakamura, H. and Hastings, J. 1988. Creatine accelerates the circadian clock in a unicellular alga.. Nat. 334, 432-434.
  - Roenneberg, T., Nakamura, H., Cranmer, L., Ryan, K., Kishi, Y. and Hastings, J. 1991. Synthesis of (+)-Gonyauline, an endogenous substance shortening the period of the circadian rhythm in the unicellular alga Gonyaulax polyedra. Experientia 47, 103–106.
  - Roffwarg 1966. REM-sleep plays for the developing brain a similar role as physical exertion plays for the development of the muscles.
  - Roquefeuil, G., Djakovic, M. and Montagner, H. 1993. New data on the ontogeny of the child's sleep-wake rhythm. Chron Int. **10**, 43–53.
  - Roschke, J. and Aldenhoff, J. 1993. Estimation of the dimensionality of sleep-EEG data in schizophrenia. Europ. Arch. Psychiatry **242**, 191–196.
  - Roschke, J., Mann, K. and Fell, J. 1994. Nonlinear EEG dynamics during sleep in depression ans schizophrenia. Int. J. Neurosc. 75, 271-284.
  - Rosenberg, G. and Runcorn, S.: 1975. Growth rhythms and the history of the earth's rotation. Interdisciplinary winter conference on biological clocks and changes in the earth's rotation. Geophysical and astronomical consequences. Wiley-Interscience-London, New York, Sydney, Toronto.
  - Rosenthal, N. and Oren, D.: 1995. Light therapy. in G. Gabbard (ed.), Treatments of psychiatric disorders. 2nd edn. Vol. 1 and

2 of Proceedings of the international Congress on Chronobiology Paris 7-11 September 1997. Am. Psych. Press Washington DC. pp. 1263–1273.

- Rosenthal, N., Moul, D., Hellekson, C., Oren, D., Frank, A., Brainard, G., Murray, M. and Wehr. T. A. 1993. A multicenter study of the light visor for seasonal affective disorder: no difference in efficacy found between two different intensities. *Neuropsychopharmacology* 8, 151–160.
- Rosenthal, N., Sack, D., Gillin, J., Lewy, A., Goodwin, F., Davenport, Y., Mueller, P., Newsome, D. and Wehr, T. 1984. Seasonal affective disorder: A description of the syndrome and priliminary findings with light therapy. Arch. Gen. Psychiatr. 41, 72–80.
- Rosenwasser 1990. The circadian rhythm of the activity of BALB/c mice is very labile. Free run period and coherence of the running wheel rhythm changes spontaneously. The circadian system of this strain consists apparently of a population of weakly coupled oscillators.
- Rosenwasser, A. and Adler, N. 1986. Structure and function in circadian timing systems: Evidence for multiple coupled circadian oscillators. *Neurosc. and Biobehav. Reviews* 10, 431–448.
- Ross-Fahrhang and X 1990. Seasonal and monthly variations in the sensitivity of the ventral eye were observed.
- Roth, T. and Roehrs, T. 2000. An overview of normal and sleep disorders. *European J. Neurol.* 7 (Suppl.), 3–8.
- Rothenfluh, A., Abodeely, M., Price, J. and Young, M. 2000. Isilation and analysis of six timeless alleles that cause short- or longperiod circadian rhythms in Drosophila. *Genetics* **156**, 665–675.

Rothmann n.d.

- Rowan, W. 1926. On photoperiodism, reproductive periodicity, and the annual migrations of birds and certain fishes. *Proc. Boston Soc. Natural History* 38, 147–189.
- Ruby, N., Dark, J., Heller, H. and Zucker, I. 1998. Suprachiasmatic nucleus: role in circannual body mass and hibernation rhythms of ground squirrels. *Brain Research* 782, 63– 72.
- Ruess, B. and Eller, B. 1985. The correlation between crassualacean acid metabolism and water uptake in Senecio medley-woodii. *Planta* 166, 57–66.
- Ruf, T. 1999. The Lomb-Scargle periodogram in biological rhythm research: Analysis of incomplete and unequally spaced time-series. *BRR* 30, 178–201.
- Ruf, T. and Heldmaier, G. 1992. Reduced locomotor activity following daily torpor in the Djungarian hamster: Recovery from hypothermia?. *Naturwiss.* **79**, 574–575.
- Ruf, T. and X 1997. Peromyscus maniculatus although even here not all animals of a population react photoperiodically.
- Ruf, T., Stieglitz, A., Steinlechner, S., Black, J. and Heldmaier, G. 1993. Cold exposure and food restriction facilitate physiological responses to short day photoperiodism in Djungarian hamster (Phodopus sungorus). J. exp. Zool. 267, 104–112.
- Runcorn, S. 1966. Corals as palaeontological clocks. *Scientific American* **215**(October), 26–33.
- Ruoff, P. and Rensing, L. 1996. The temperature-compensated Goodwin model simulates many circadian clock properties. *Journal of Theoretical Biology* 179, 275–285.

- Ruoff, P., Behzadi, A., Hauglid, M., Vinsjevik, M. and Havas, H. 2000a. ph homeostasis of the circadian sporulation rhythm in clock mutants of Neurospora crassa. *Chronobiol. Intern.* 17, 733–750.
- Ruoff, P., Rensing, L., Kommedal, R. and Mohsenzadeh, S. 1997. Modeling temperature compensation in chemical and biological oscillators. *Chronobiology International* 14, 499–510.
- Ruoff, P., Vinsjevik, M. and Rensing, L. 2000b. Temperature compensation in biological oscillators: A challenge for joint experimental and theoreticaö analysis. *Comments Theor. Biol.* 6, 361–382.
- Ruoff, P., Vinsjevik, M., Monnerjahn, C. and Rensing, L. 1999. The Goodwin oscillator: On the importance of degradation reactions in the circadian clock. JBR 14, 469–479.
- Ruoff, P., Vinsjevik, M., Monnerjahn, C. and Rensing, L. 2001. The Goodwin model: Simulating the effect of light pulses on the circadian sporulation rhythm of Neurospora crassa. *Journal of theoretical Biology* 209, 29–42.
- Rusak, B. and Morin, L. 1976. Testicular responses to photoperiod are blocked by lesions of the suprachiasmatic nuclei in golden hamsters. *Biol. Reprod* 15, 366–374.
- Russel and et al. 1980. transferred axillary pheromones to the upper lip.
- Russo, V. 1986. Are carotenoids the blue light photoreceptor in the photoinduction of protoperithecia in Neurospora crassa?. *Planta* 168, 56–60.
- Russo, V. 1988. Blue light induces circadian rhythms in the bd mutant of Neurospora: double mutants bd,wc-1 and bd,wc-2 are blind. J. Photochem. Photobiol. B **2**, 59–65.

Russo, V. and et al 1996.

- Rutenfranz, J. 1978. Schichtarbeit und biologische Rhythmik. Arzneimittel-Forschung/Drug Res. 28, 1867–1872.
- Rutenfranz, J., Colquhoun, W., Knauth, P. and Ghata, J. 1977. Biomedical and psychological aspects of shift work.. Scand. J. Work Environm. Health 3, 165–182.
- Rutila, J., Suri, V., Le, M., So, W., Rosbash, M. and Hall, J. 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of Drosophila period and timeless.. *Cell* 93, 805–814.
- Saarela, S. and Reiter, R. 1994. Function of melatonin in thermoregulatory processes. *Life-Sci.* 54, 295–311.
- Sabrosky, C., Larsen, I. and Nabours, R. 1933. Experiments with light upon reproduction, growth and diapause in the grouse locusts (Acrididae, Tetriginae). *Trans. Kansas Acad. Sci.* 36, 298.
- Sachs, J. 1865. Wirkung des Lichts auf die Blüthenbildung unter Vermittlung der Laubblätter. Bot. Zeitung 23, 117, 125, 133.
- Sachs, J. 1880. Arb. Botan. Institut Würzburg 3, 452–488.
- Sack, R., Hughes, R., Edgar, D. and Lewy, A. 1997. Sleep-promoting effects of melatonin: At what dose, in whom, under what conditions, and by what mechanisms?. *Sleep* 20, 908–915.
- Saigusa, M. 1986. The circa-tidal rhythm of larval release in the incubating crab Sesarma. J. comp. Physiology A 159, 21–31.
- Saigusa, M. and Hidaka, T. 1978. Semilunar rhythm in the zoea-release activity of the land crabs Sesarma. *Oecologia* 37, 163–176.

- Saito, H., Takeuchi, Y., Takeda, R., Hayashi, Y., Watanabe, K., Shin, M., Imai, K., Isobe, M. and Yamashita. O. 1994. The core and complementary sequence responsible for biological activity of the diapause hormone of the silkworm, Bombyx mori. *Peptides (Tarrytown)* 15, 1173–1178.
- Salgado, E., Murray, D. and Lloyd, D. 2002. Some antidepressant agents (Li+, monoamine oxidase type A imhibitors) perturb the ultradian clock in Saccharomyces cerevisiae. *Biological Rhythm Research*.
- Salisbury, F. 19. Photoperiodism. Horticulture Reviews 4, 66–105.
- Salisbury, F. and Ross, C.: 1991. Plant Physiology. 4 edn. Wadsworth Publ. Co. Belmont, California.
- Salisbury, F., Gillespie, L. and Rorabaugh, P. 1988. Gravitropism in higher plant shoots. V. Changing sensitivity to auxin. *Plant Physiol.* 88, 1189–1194.
- Samuelsson, G., Sweeney, B., Matlick, H. and Prezelin, B. 1983. Changes in photosystem II account for the circadian rhythm in photosynthesis in Gonyaulax polyedra. *Pl.Phys.* 73, 329–331.
- Sangoram, A., Saez, L., Antoch, M., Gekakis, N., Staknis, D., Whiteley, A., Fruechte, E., Vitaterna, M., Shimomura, K., King, D., Young, M., Wetz, C. and Takahashi, J. 1998. Mammalian circadian autoregulatory loop: A timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate clock-bmall-induced transcription. *Neuron* **21**, 1101–1113.
- Sankrithi, N. and Eskin, A. 1999. Effects of cyclin, dependent kinase inhibitors on transcription and ocular circadian rhythm of Aplysia. *Journal of Neurochemistry* 72, 605– 613.

- Santschi 1911. Observations et remarques critiques sur le mécanisme de l'orientation chez le fourmis. *Rev.Suisse Zool.* **19**, 301–339.
- Sargent, M. and Briggs, W. 1967. The effects of light on a circadian rhythm of conidiation in Neurospora.. *Pl. Physiol.* **41**, 1504–1510.
- Sargent, M. and Kaltenborn, S. 1972. Effects of a medium composition and carbon dioxide on circadian conidiation in Neurospora. *Plant Physiol.* 50, 171–175.
- Sargent, M., Briggs, W. and Woodward, D. 1966. Circadian nature of a rhythm expressed by an invertaseless strain of Neuropora crassa.. *Pl. Physiol.* 41, 1343–1349.
- Sassone-Corsi 1998. 17.6 Organization of circadian rhythms and their evolution.
- Sato, Y., Ikeda, M. and Yamashita, O. 1994. Neurosecretory Cells Expressing the Gene for Common Precursor for Diapause Hormone and Pheromone Biosynthesis-Activating Neuropeptide in the Suboesophageal Ganglion of the Silkworm Bombyx mori.. General and Comparative Endocrinology 96, 27–36.
- Satroutdinov, A., Kuriyama, H. and Kobayashi, H. 1992. Oscillatory metabolism of Saccharomyces cerevisiae in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 261–267.
- Saunders, D. 1966. Larval diapause of maternal origin II. The effect of photoperiod and temperature on Nasonia vitripennis. J. Insect Physiology 12, 569–581.
- Saunders, D. 1971. The temperature compensated pp clock 'programming' development and pupal diapause in the flesh-fly, Sarcophaga argyrostoma. *JIP* **17**, 801–812.
- Saunders, D. 1973a. The photoperiodic clock in the flesh-fly, Sarcophaga argyrostoma. J. Insect Physiol. 19, 1941–1954.

- Saunders, D. 1973b. Thermoperiodic control of diapause, internal coincidence. *Science* 181, 358–360.
- Saunders, D.: 1982. Insect clocks. 2 edn. Pergamon Press New York.
- Saunders, D. 1992. The photoperiodic clock and 'counter' in Sarcophaga argyrostoma: Experimental evidence consistent with 'external coincidence' in insect photoperiodism. J. Comp. Physiology A170, 121–127.
- Saunders, D. 1998. The circadian basis of ovarian diapause regulation in Drosophila melanogaster: Is the period gene causally involved in photoperiodic time measurement?
- Saunders, D. and Denlinger, D. 1971. *J.Ins.Physiol.* 17, 1815–.
- Saunders, D. and Lewis, R. 1987a. A damped c oscillator model of an insect pp clock III Circadian and 'hourglass' responses. J. theoretical Biology 128, 73–85.
- Saunders, D. and Lewis, R. 1987b. A damped circadian oscillator model of an insect pp clock II Simulations of the shapes of the pp response curves.. J. theoretical Biology 128, 61–71.
- Saunders, D., Gillanders, S. and Lewis, R. 1994. Light-pulse phase response curves for the locomotor activity rhythm in period mutants of Drosophila melanogaster. J.Insect Physiol. 40, 957–968.
- Saunders, D., Henrich, V. and Gilbert, L. 1989. Induction of diapause in Drosophila melanogaster: photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement.. PNAS 86, 3748–3752.
- Schaefer, K., Kerr, C., Buss, D. and Haus, E. 1979. Effect of 18-h watch schedules on circadian cycles of physiological functions during

submarine patrols.. Undersea Biomed. Res., Submarine Supplement pp. S81–S90.

- Schäfer, E. 1907. On the incidence of daylight as a determining factor in bird-migration. *Nature* 77, 159–163.
- Schaffelke, B. and Luening, K. 1994. A circannual rhythm controls seasonal growth in the kelps Laminaria hyperborea and L. digitata from Helgoland (North Sea). *European Jour*nal of Phycology 29, 49–56.

Schauer 1964.

- Scheper, T., Klinkenberg, D., Pelt, J. and Pennartz, C. 1999. A model of molecular circadian clocks: Multiple mechanisms for phase shifting and a requirement for strong nonlinear interactions. JBR 14, 213–220.
- Schlehe, J.: 1978. Das Blut der fremden Frauen: Menstruation in der anderen und in der eigenen Kultur. Campus Verlag Franfkurt, New York.

Schmid and Koop 1983. chloro movement.

- Schmidt-Koenig: 1975. *Migration and homing in animals*. Springer Berlin, Heidelberg, New York.
- Schneegurt, M., Sherman, D. and Sherman, L. 1997. Growth, physiology, and ultrastructure of a diazotrophic cyanobacterium, Cyanothece sp. strain ATCC 51142, in mixotrophic and chemoheterotrophic cultures.. Journal of Phycology 33, 632–642.
- Scholübbers, H., Taylor, W. and Rensing, L. 1984. Are membrane properties essential for the circadian rhythm of Gonyaulax?. *Am.J.Physiol.* 247, R250–256.
- Schrempf, M.: 1975. Eigenschaften und Lokalisation des Photorezeptors für phasenverschiebendes Störlicht bei der Blütenblattbe-

wegung von Kalanchoe blossfeldiana (v. Poelln.). Phd thesis. University of Tübingen.

- Schrempf, M. 1977. Studies on the circadian rhythm of petal movement in kalanchoe blossfeldiana. J. Interdisc. cycle Res. 8, 396– 400.
- Schrempf, M. 1980. The action of abscissic acid on the circadian petal movement of Kalanchoe blossfeldiana.. Z. Pflanzenphysiol. 100, 397–407.
- Schröder-Lorenz, A. and Rensing, L. 1987. Circadian changes in protein-synthesis rate and protein phosphorylation in cell-free extracts of Gonyaulax polyedra.. *Planta* **170**, 7–13.

Schröter n.d.. Belly plants.

Schulz, R., Pilatus, U. and Rensing, L. 1985. On the role of energy metabolism in Neurospora circadian clock function. *Chronobiol. Intern.* 

Schussing 1954.

- Schuster, J.: 1996. Untersuchungen zur Circumnutation des Hypokotyls von Arabidopsis thaliana und Helianthus annuus. PhD thesis. Universität Tübingen.
- Schuster, J. and Engelmann, W. 1997. Circumnutations of Arabidopsis thaliana seedlings. *Biological Rhythm Research* 28, 422–440.
- Schwartz, P., Brown, C., Wehr, T. and Rosenthal, N. 1996a. Winter seasonal affective disorder: A follow-up study of the first 59 patients of the National Institute of Mental Health Seasonal Studies Program. American Journal of Psychiatry 153, 1028–1036.
- Schwartz, P., Rosenthal, N. and Wehr, T. 1998. Serotonin 1A receptors, melatonin, and the proportional control thermostat in patients with winter depression. Archives of General Psychiatry 55, 897–903.

- Schwartz, W. and Gainer, H. 1977. Suprachiasmatic nucleus: use of 14C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197, 1089–1091.
- Schwartz, W. and Zimmerman, P. 1990. Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL76 inbred mouse starins. J. Neuroscience 10, 3685–3694.
- Schwartz, W. and Zimmerman, P. 1991. Lesions of the suprachiasmatic nucleus disrupt circadian locomotor rhythms in the mouse. *Physiology and Behavior* 49, 1283–1288.
- Schwartz, W., Peters, R., Aronin, N. and Bennett, M. 1996b. Unexpected c-fos gene expression in the suprachiasmatic nucleus of mice entrained to a skeleton photoperiod. *Journal of Biological Rhythms* 11, 35–44.
- Schwartz, W., Smith, C. and Davidsen, L.: 1979. In vivo glucose utilization of the suprachiasmatic nucleus.. in M. Suda, O. Hayaishi and H. Nakagawa (eds), *Biological Rhythms* and their central mechanism. Elsevier North-Holland New York. pp. 355–367.
- Schweiger 1984. Auf der Suche nach dem molekularen Mechanismus der circadianen Uhr.. Mannheimer Forum, Boehringer, Mannheim 84/85, 115–172.
- Schweiger, H. 1977. Circadian rhythms in unicellular organisms: An endeavor to explain the molecular mechanism. *Int. Rev. Cytol.* 51, 315–342.
- Schweiger, H. and et al. 1986. J. Cell. Sc. 4 (Suppl.), 181.
- Schweiger, H., Broda, H., Wolff, D. and Schweiger, G.: 1983. A method for the simultaneous long-term recording of oxygen evolution and chloroplast migration in an individual cell of Acetabularia. *in* Gnaiger and Forstner (eds),

Polarographic oxygen sensors. Springer Berlin, Heidelberg. chapter II.7, pp. 190–194.

- Schweiger, Wallraff and Schweiger 1964. Science 146, 658–659.
- Schweizer, K. 1994. Synchronisation der Menstruation. Leibniz Kolleg, Trimester-Arbeit.
- Segal, E. 1960. Discussion to the paper of Marshall, A. J.. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biology pp. 504–505.
- Sehgal, A., Price, J. and Young, M. 1992. Ontogeny of a biological clock in Drosophila melanogaster. *Proc. Nat. Acad. Science (US)* 89, 1423–1427.
- Seidman, G. and Riggan, W. 1968. Stomatal movements: A yearly rhythm. Nature 217, 684–685.
- Sekijima, T., Kondo, J., Ohtsu, T. and Kondo, N.: 2000. Endogenous changes in hibernation-specific protein in chipmunk cerebrspinal fluid. in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), Life in the cold. Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 369–376.
- Selby, C. and Sancar, A. 1999. A third member of the photolyase/blue-light photoreceptor family in Drosophila: A putative circdain photoreceptor. *Photochem. Photobi*ol. 69, 105–107.
- Seo, K. and Fritz, L. 2000. Cell ultrastructural changes correlate with circadian rhythms in Pyrocystis lunula (Pyrrophyta). JOURNAL OF PHYCOLOGY 36, 351–358.
- Shanahan, T., Zeitzer, J. and Czeisler, C. 1997. Resetting the melatonin rhythm with light in humans. *Journal of Biological Rhythms* 12, 556–567.

- Sharma, V. 1996. Light-induced phase response curves of the circadian activity rhythm in individual field mice, Mus booduga.. Chronobiology International 13, 401–409.
- Sharma, V. and Chandrashekaran, M. 1999. Precision of a mammalian circadian clock. *Naturwissenschaften* 86, 333–335.
- Sharma, V., Chandrashekaran, M. and Nongkynrih, P. 1997. Daylight and Artificial light phase response curves for the circadian rhythm in locomotor activity of the field mouse Mus booduga. *Biol Rhythm Res* 28, 39–49.
- Sharma, V., Chidambaram, R., Singh, T., Lingakumar, K., Subbaraj, R. and handrashekaran, M. 2000. Irradiance-dependency of UV-A induced phase shifts in the locomotor activity rhythm of the field mouse Mus booduga.. Chronobiol Internat 17, 777–782.
- Sharma, V., Singaravel, M., Subbaraj, R. and Chandrashekaran, M. 1999. In the field mouse Mus booduga melatonin phase response curves (PRCs) have different time course and wave form relative to the light PRC. J Pineal Res 26, 153–157.

Sharp 1960. J. Endocrin.

- Shen and x 1997. xx In another mutant mouse, which lacks a neuronal adhesion molecule with polysialic acid, the circadian rhythm is changed.
- Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H. and Hattori, K. 1982. Circadian rhythmic changes in neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamic slice. *Brain Re*search 247, 154–158.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J., Dunlap, J. and Okamura,

H. 1997. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* **91**, 1043–1053.

Shome 1996. epilepsy and sleep disturbances.

Siegel and McGinty 1977.

Siegelman, H., Turner, B. and Hendricks, S. 1966. The chromophore of phytochrome. *Plant Physiol.* 41, 1289–.

Sievers, A. 1990.

- Sievers, A., Buchen, B. and Hodick, D. 1996. Gravity sensing in tip-growing cells. *Trends* in Plant Science 1, 273–279.
- Silver, R., Lehman, M., Gibson, M., Gladstone, W. and Bittman, E. 1990. Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Research* 525, 45–58.
- Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P. and Lehman, M. 1996. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controls circadian locomotor rhythms. *Nature* 382, 810–813.
- Silyn-Roberts, H. and Engelmann, W. 1986. Thalassomyxa australis: A model organism for the evolution of circadian rhythms?. *Endocyt. C.Res.* 3, 239–242.
- Silyn-Roberts, H., Engelmann, W. and Grell, K. 1986. Thalassomyxa australis rhythmicity I. Temperature dependence.. *Interdisc. Cycle Res.* 17, 181–187.
- Simmons, C., Soll, D. and Migliaccio, F. 1995. Circumnutation and gravitropism cause root waving in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* 46, 143–150.
- Simon, R., Igeno, M. and Coupland, G. 1996. Activation of floral meristem identity genes in Arabidopsis. *Nature* **384**, 59–62.

- Simpson, G., Gendall, A. and Dean, C. 1999. When to switch to flowering. Ann. Rev. Cell. Dev. Biology 99, 519–550.
- Simpson, S. and Galbraith, J. 1906. Observations on the normal temperature of the monkey and its diurnal variation, and of the effect of changes in the daily routine on this variation. *Trans. Roy. Sopc. Edinburgh* **45**, 65–106.
- Simpson, S., Urbanski, H. and Robinson, J. 1983. The pineal gland and the photoperiodic control of luteinizing hormone secretion in intact and castrated Japanese quail. J. Endocrinol. 99, 281–287.
- Simpson, W., Bellamy, N., Bohlen, J. and Halberg, F. 1973. Double blind trial of a possible chronobiotic (Quiadon)R. International Journal Chronobiology 1, 287–311.
- Sing, H. and Hegge, F. n.d.. Complex demodulation: Technique and applications. xx.
- Siqueira, L. and Valio, I. 1992. Revista Brasileira de Botanica 15, 35–138A.
- Skene, D., Lockley, S. and Thapan, K. 1999. Effects of light on human circadian rhythms. *REPROD NUTR DEV* **39**, 295–304.
- Smietanko, A., Stader, L., Förster, C. and Engelmann, W. 1988. Thalassomyxa australis rhythmicity II. No entrainment by lightdark-cycles and temperature cycles?. J. Interdisc. Cycle Res. 19, 275–288.
- Smith, J. and Lüttge, U. 1985. Day-night changes in leaf water relations associated with the rhythm of crassulacean acid metabolism in Kalanchoe daigremontiana. *Planta* 163, 272–282.
- Sokolove, P. and Bushell, W. 1978. The chi square periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms. *J. theor. Biology* **72**, 131– 160.

- Sollars, P., Kimble, D. and Pickard, G. 1995. Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic heterografts. J. Neurosciences 15, 2109–2122.
- Somero, G. 1996. Temperature and proteins: Little thiongs mean a lot. News Physiol. Sci. 11, 72–77.
- Somers, D., Devlin, P. and Kay, S. 1998. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science* 282, 1488–1490.
- Sommer, K.: 1990. *Der Mensch*. Volk und Wissen Berlin.
- Soni, B., Philp, A., Knox, B. and Foster, R. 1998. Novel retinal photoreceptors. *Nature* 394, 27–28.
- Southmaid, S., Cairns, J. and David, M. 1991. Sleep disturbance in depression reconsidered. *Can. J. Psychol.* 36, 366–373.
- Spruyt, E. and De Greef, J. 1987. Endogenous rhythmicity in water uptake by seeds.. Ann. Bot. **60**, 171–176.
- Spruyt, E., Verbelen, J. and DeGreef, J. 1983. Diurnal rhythms and circannual changes in enzyme activity in Phaseolus. Arch. Int. Physiol. Biochim. 91, B39–40.
- Staesche, K. 1966. Die jahresperiodische Entwicklung des Wurzel- und Sprossystems von Symphytum officinale L. und ihre Beziehung zu Speicherung und Verbrauch der Kohlenhydrate. *Planta* **71**, 268–282.
- Stal, L. and Krumbein, M. 1985. Nitrogenase activity in the non-heterocystous cyanobacterium Oscillatoria sp. grown under alternating light-dark cycles.. Arch. Microbiol. 143, 67–71.

- Stalfelt, M. 1963. Diurnal dark reactions in the stomatal movements. *Physiologia Plantarum* 16, 756–766.
- Stanewsky, R., Frisch, B., Brandes, C., Hamblen-Coyle, M., Rosbash, M. and Hall, J. 1997. Temporal and spatial expression patterns of transgenes containing increasing amounts of the Drosophila clock gene period and a lacZ reporter: mapping elements of the PER protein involved in circadian cycling.. J. Neurosci. 17, 676–696.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S., Rosbash, M. and Hall, J. 1998. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in Drosophila.. *Cell* **95**, 681–692.
- Steinheil, W.: 1969. Versuche zur Abhängigkeit der circadianen Rhythmik von der Atmungskettenenergie bei Kalanchoe blossfeldiana.. PhD thesis. University of Tübingen, Germany.
- Steinlechner, R. and Heldmaier, G. 1989. Photoperiodic and thermal regulation in vertebrate body temperature rhythms and thermogenetic acclimation. JBR 4, 251–265.
- Steinlechner, S. 1992. Melatonin: an endocrine signal for the night lenght. Verh. Dtsch.Zool. Ges. 85, 217–229.
- Steinlechner, S. and Niklowitz, P. 1992. Impact of photoperiod and melatonin on reproduction in small mammals.. Animal Reprod. Sci. 30, 1–28.
- Stephan, F. and Nunez, A. 1977. Elimination of circadian rhythms in drinking, activity, sleep and temperature by isolation of the suprachiasmatic nuclei. *Behav. Biol.* 20, 1–16.
- Stephan, F. and Zucker, I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hy-
pothalamic lesions.. Proc. National Academy Sciences, USA **69**, 1583–1586.

- Steriade, M., Curró Dossi, R. and Nuñez, A. 1991. Network modulation f a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in the sleep delta waves: Cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. J. Neurosc. 11, 3200– 3217.
- Steriade, M., McCormick, D. and Sejnowski, T. 1993. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262, 679–685.
- Stetson, M. 1971. Neuroendocrine control of photoperiodically induced fat deposition in white-crowned sparrow. J. experiment. Zoology 176, 409–413.
- Stetson, M. and Watson-Whitmyre, M. 1976. Nucleus suprachiasmaticus: The biological clock in the hamster?. Science 191, 197–199.
- Steudle, E., Smith, J. and Lüttge, U. 1980. Water-relation parameters of individual mesophyll cells of the crassulacean acid metabolims plant Kalanchoe daigremontiana. *Plant Physiol.* 66, 1155–1163.
- Storey, K. and Storey, J.: 2000. Gene expression and protein adaptations in mammalian hibernation. in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), Life in the cold. Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 303–313.
- Strack, S. and Jacklet, J. 1993. Antiserum to an eye-specific protein identifies photoreceptor and circadian pacemaker neuron projections in Aplysia protein could be involved in the maintenance or regulation of the retinal afferent pathways, including the pacemaker neuron axons. J. Neurobiol. 24, 552–570.

- Strogatz, S.: 1986. The mathematical structure of the human sleep-wake-cycle.. Springer.
- Strogatz, S., Kronauer, R. and Czeisler, C. 1987. Circadian pacemaker interferes with sleep onset at specific times each day: role in insomnia. Am. J. Physiol. 253, R172–R178.
- Strumwasser n.d.. Aplysia: sleep mechanism uses a functional unit of neurons in the central nervous system.
- Su, Z., Ikeda, M., Sato, Y., Saito, H., Imai, K., Isobe, M. and Yamashita, O. 1994. Molecular characterization of ovary trehalase of the silkworm, Bombyx mori and its transcriptional activation by diapause hormone. *Biochimica et Biophysica Acta* 1218, 366–374.
- Sulzman, F., Gooch, D., Homma, K. and Hastings, J. 1982. Cellular autonomy of the Gonyaulax circadian clock. *Cell Biophysics* 4, 97–103.
- Suri, V., Qian, Z., Hall, J. and Rosbash, M. 1998. Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in Drosophila melanogaster. *Neuron* 21, 225– 234.
- Sutton, B.: 1974. Regulation of carbohydrate metabolism in succulent plants. PhD thesis. Australian National University, Canberra.
- Sweeney, B. 1960a. The photosynthetic rhythm in single cells of Gonyaulax polyedra.. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biology 25, 140–148.
- Sweeney, B. 1960b. The potential content of Gonyaulax polyedra and phase changes in the circadian rhythm of stimulated bioluminescence by short exposures to ethanol and valinomycin. *Plant Physiol.* **53**, 337–342.
- Sweeney, B. 1963. Resetting the biological clock in Gonyaulax with ultraviolett light. *Plant Physiology* **38**, 704–708.

- Sweeney, B. 1974a. A physiological model for circadian rhythms derived from the Acetabularia paradox. Int. J. Chronobiology 2, 25–33.
- Sweeney, B. 1974b. The potassium content of Gonyaulax polyedra and phase changes in the circadian rhythm of stimulated bioluminescence by short exposures to ethanol and valinomycin. *Plant Physiol.* **53**, 337–342.
- Sweeney, B.: 1981a. The circadian rhythms in bioluminescence, photosynthesis and organellar movements in the large dinoflagellate, Pyrocystis fusiformis.. in H. Schweiger (ed.), International Cell Biology 1980-1981. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 807–814.
- Sweeney, B. 1981b. Circadian timing in the unicellular autotrophic dinoflagellate, Gonyaulax polyedra. *Ber.D.Bot.Ges.* 94, 335–345.
- Sweeney, B.: 1984. Circadian rhythmicity in dinoflagellates.. in Spector (ed.), Dinoflagellates. Ac. Press NY. pp. 343–364.
- Sweeney, B. and Borgese, A. 1989. A circadian rhythm in cell division in a prokaryote, the cyanobacterium Synechococcus WH7803. J.Physiol 25, 183–186.
- Sweeney, B. and Hastings, J. 1958. Rhythmic cell division in populations of Gonyaulax polyedr. J.Protozoology 5, 217–224.
- Sweeney, B. and Hastings, J. 1960. Effects of temperature upon diurnal rhythms.. Cold Spring Harbor Symp. 25, 87–104.
- Sweeney, B. and Haxo, F. 1961. Persistence of a photosynthetic rhythm in enucteated Acetabularia. *Science* **134**, 1361–1363.
- Sweeney, B. and Herz, J. 1977. Evidence that membranes play an important role in circadian rhythms. *Proc. XII Int. Conf. Int. Soc. Chronobiol.* pp. 751–761.

- Sweeney, B., Prezelin, B., Wong, D. and Govindjee 1979. In vivo chlorophyll a fluorescence transient and the circadian rhythm of photosynthesis in Gonyaulax polyedra. *Photochem. Photobiol.* **30**, 309–311.
- Sweeney, B., Tuffli, C. and Rubin, R. 1967. The circadian rhythm in photosynthesis in Acetabularia in the presence of actinomycin D, Puromycin, and chloramphenicol. J. gen. Physiol. 50, 647–659.
- Swift, E. and Taylor, W. 1967. Bioluminescence and chloroplast movement in the dinoflagellate Pyrocystis lunula. J. Phycol. 3, 77–81.
- Taiz, L. and Zeiger, E.: 1998. *Plant Physiology*.2 edn. Sinauer Assoc. Inc.
- Takahashi, K., Fujino, K., Kikuta, Y. and Koda, Y. 1994. Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Science* 100, 3–8.
- Takimoto, A. and Hamner, K. 1964. Effect of temperature and preconditioning on photoperiodic response of Pharbitis nil. *Plant Physiology* **39**, 1024–1030.

Tamagawa 1993.

- Tani, N., Kamada, G., Ochiai, K., Isobe, M., Suwan, S. and Kai, H. 2001. Carbohydrate moiety of time.interval measuring enzyme regulates time measurement through its interaction with time-holding peptide PIN. J. Biochem. 129, 221–227.
- Tauber, E. and Kyriacou, B. 2001. Insect photoperiodism and circadian clocks: Models and mechanisms. J Biol. Rhythms 16, 381– 390.
- Taylor, W. and Hastings, J. 1979. Aldehydes phase shift the Gonyaulax polyedra clock.. J. comp. Physiol. 130, 359–362.

- Taylor, W., Gooch, V. and Hastings, J. 1979. Period shortening and phase shifting effects of ethanol in the Gonyaulax. glow rhythm. J. Comp. Physiol. 130, 355–358.
- Taylor, W., Krasnow, R., Dunlap, J., Broda, H. and Hastings, J. 1982. Critical pulses of anisomycin drive the circadian oscillator in Gonyaulax towards its singularity.. JCP 148, 11–25.).
- Taylorson, R. and Hendricks, S. 1977. Dormancy in seeds.. Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 331–154.
- Techel, D., Gebauer, G., Kohler, W., Braumann, T., Jastorff, B. and Rensing, L. 1990. On the role of Ca2+-calmodulin-dependent and cAMP-dependent protein phosphorylation in the circadian rhythm of Neurospora crassa. J. comp. Physiol. B 159, 695–706.
- Teicher, M., Glod, C., Oren, D., Schwartz, P., Luetke, C., Brown, C. and Rosenthal, N. 1995. The phototherapy light visor: More to it than meets the eye. *American Journal of Psychiatry* 152, 1197–1202.
- Teng, C., Akerman, D., Cordas, T., Kasper, S. and Vieira, A. 1995. Seasonal affective disorder in a tropical country: A case report. *Psychiatry Research* 56, 11–15.
- Terborgh, J. and McLeod, G. 1967. The photosynthetic rhythm of Acetabularia crenulata.
  I. Continuous measurements of oxygen exchange in alternating light-dark regimes and in constant light of different intensities. *Biol. Bull.* 133, 659669.
- Terman, J. and Terman, M. 1999. Photopic and scotopic light detection in patients with seasonal affective disorder and control subjects. *Biological Psychiatry* 46, 1642–1648.

- Terman, M., Amira, L., Terman, J. and Ross, D. 1996. Predictors of response and nonresponse to light treatment for winter depression. American Journal of Psychiatry 153, 1423–1429.
- Terman, M., Terman, J. and Ross, D. 1998. A controlled trial of timed bright light and negative air ionization for treatment of winter depression. Archives of General Psychiatry 55, 875–882.
- Terry, M. 1997. fPhytochrome chromophoredeficient mutants. *Plant, Cell and Environment* 20, 740–745.
- Thalen, B., Kjellman, B., Morkrid, L., Wibom, R. and Wetterberg, L. 1995. Light treatment in seasonal and nonseasonal depression. Acta Psychiatrica Scandinavica 91, 352–360.

Theimer n.d., seed germination.

- Thomas, B.: 1998. Photoperiodism: an overview. in P. Lumsden and A. Millar (eds), Biological rhythms and photoperiodism in plants. Environmental plant biology. Bios Scientific, Oxford. pp. 151–165.
- Thomas, B. and Vince-Prue, D.: 1997. *Photoperiodism in plants*. Academic Press, San Diego.
- Thompson, C., Childs, P., Martin, N., Rodin, I. and Smythe, P. 1997. Effects of morning phototherapy on circadian markers in seasonal affective disorder. *British Journal of Psychiatry* 170, 431–435.
- Thorell, L., Kjellman, B., Arned, M., Lindwall-Sundel, K., Walinder, J. and Wetterberg, L. 1999. Light treatment of seasonal affective disorder in combination with citalopram or placebo with 1-year follow-up. *International Clinical Psychopharmacology* 14 (Suppl.2), S7–S11.

- Thorey, I., Rode, I., Harnau, G. and Hardeland, R. 1987. Conditionality of phase resetting by inhibitors of 80S translation in Gonyaulax polyedra. JCP 157B, 85–89.
- Thwaites 1965. Photoperiodic control of breeding activity in the 'Southdown' ewe with particular reference to the effects of an equatorial light regime.. J. agr. Sciences **65**, 57– 64.
- Ting, I. 1985. Crassulacean acid metabolism. Ann. Review Plant Physiology 36, 595–622.
- Ting, I. and Gibbs, M.: 1982. Crassulacean acid metabolism.. am. soc. pl. physiol. rockville, md edn. Waverly Press, Baltimore.
- Tizio, R. 1971. Action et role probable de certaines gibberellines (A1,A3, A4, A5, A9, et A13) sur la croissance des stolones et la tuberalization de la pomme de terre (Solanum tuberosum L.). Potato Res. 14, 193–204.
- Tobin and Kehoe 1994. Seminars in Cell Biology pp. 1–12.
- Toda, M. 1979. A preliminary note on winter Drosophilid flies in southern Japan, with special reference to reproductive conditions. *Low Temp. Science* **B37**, 39–45.
- Tomioka, K. and Tomioka, F. 1991. Development of circadian sleep-wakefulness rhythmicity of three infants.. JiCR 22, 71–80.
- Touitou, Y.: 1998. Biological clocks: Mechanisms and applications. Proceedings of the International Congress on Chronobiology Paris 7 - 11 September 1997. Elsevier Amsterdam.
- Tournois, J. 1911. Anomalies florales du houblon japonais et du chanvre dèterminèe par des semis hâtifs. C. R. Acad. Sci. 153, 1017.

- Tournois, J. 1912. Influence de la lumière sur la floraison du houblon japonais et du chanvre. C. R. Acad. Sci.
- Trachsel, L., Edgar, D. and Heller, H. 1991. Are ground squirrels sleep deprived during hibernation?. Am. J. Physiol. 260, R1123– 1129.
- Trayhurn, P., Beattie, J. and Rayner, D.: 2000. Leptin - signals and secretions from white adipose tissue. in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), Life in the cold. Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 459–469.
- Trevathan, W., Burleson, M. and Gregory, W. 1993. No evidence for menstrual synchrony in lesbian couples. *Pseuchoneuroendocrino*logy 18, 171–177.
- Trolldenier, G. 1967. Bewegung der Spaltöffnungen. *Publ. Wiss. Film, Göttingen* **AII**(4), 467–474.

Truman and Levine 1981.

- Tsinoremas, N., Ishiura, M., Kondo, T., Andersson, C., Tanaka, K., Takahashi, H., Johnson, C. and Golden, S. 1996. A sigma factor that modifies the circadian expression of a subset of genes in cyanobacteria. *EMBO Journal* 15, 2488–2495.
- Tumlinson, J., Lewis, W. and Vet, L. 1993. How parasitic wasps find their hosts. Scientific American 268(march), 46-xx.
- Turek, F. 1986. Circadian principles and design of rotating shift work schedules.. Am. J. Physiology.
- Tweedy, D. and Stephen, W. 1971. Lightrefractive emergence rhythm in the leafcutter bee, Megachile rotundata (F.) (Hymenoptera, Apoidea). *Experientia* 26, 377–379.

Twente, J. and Twente, J.: 1978. Autonomic regulation of hibernation by Citellus and Eptesicus. in L. Wang and J. Hudson (eds), Strategies in the cold: Natural torpor and thermogenesis. Academic Press, New York. pp. 327– 373.

Tyson 1987.

- Ulrych, T. and Bishop, T. 1975. Maximum entropy spectral analysis and autoregressive decomposition. *Rev. Geophys. Space Phys.* 13, 183–200.
- Underwood, H. and Edmonds, K. 1995. The circadian system of thermoregulation in Japanese quail II Multioscilator control. J. Biol. Rhythms 10, 234–247.
- Van Gelder, R. and X 1991.

Van Reeht and X 1997.

- Van Swinderen, B. and Hall, J. 1995. Analysis of conditioned courtship in dusky-Andante rhythm mutants of Drosophila. *Learn. Mem.* 2, 49–61.
- Vanden Driessche, T. 1966. Circadian rhythms in Acetabularia: Photosynthetic capacity and chloroplast shape. *Exp. Cell Research* 42, 18–30.
- Vanden Driessche, T. 1967a. grafted arrhythmic stalks of Acetabularia on rhizoids of rhythmic algae. Afterward a rhythmic O {2} production was observed.
- Vanden Driessche, T. 1967b. The nuclear control of the chloroplasts ´ circadian rhythms. Sci. Progr., Oxford 55, 293–303.
- Vanden Driessche, T. 1970. Inability of rifampicin to inhibit circadian rhythmicity in Acetabularia in spite of RNA synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 224, 631–634.

- Vanden Driessche, T. and Bonotto, S. 1969. The circadian rhythm in RNA synthesis in Acetabularia mediterranea. *Biochimica and Biophysica Acta* 179, 58–66.
- Vanden Driessche, T., Dujardin, E., Magnusson, A. and Sironval, C. 1976. Acetabularia mediterranea: Circadian rhythms of photosynthesis and associated changes in molecular structure of the thylakoid membranes. *Int.J. Chronobiol.* 4, 111–124.
- Vanhatalo, V., Leinonen, K., Rita, H. and Nygren, M. 1996. Effect of prechilling on the dormancy of Betula pendula seeds. *Canadian Journal of Forest Research* 26, 1203–1208.
- Vaz Nunes, M. 1998. A double circadian oscillator model for quantitative photoperiodic time measurement in insect and mites. J. Theoretical Biology 194, 299–311.
- Vaz Nunez, M. and Saunders, D. 1999. Photoperiodic time measurement in insects: A review of clock models. J. Biolog. Rhythms.
- Vaz Nunez, M., Lewis. R. D. and Saunders, D. 1991. A coupled oscillator feedbacksystem, as a model for the photoperiodic clock in insects and mites. I. The basic control system as a model for circadian rhythms. J. theoretical Biology 152, 287–298.
- Veerman, A.: 1985. Diapause. in W. Helle and M. Sabelis (eds), Spider mites. Their biology, natural enemies and control. Vol. 1A. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. pp. 279–316.
- Vicker, M., Becker, J., Gebauer, G., Schill, W. and Rensing, L. 1988. Circadian rhythms of cell cycle processes in the marine dinoflagellate Gonyaulax polyedra.. *Chronobiol. Internat.* 5, 5–17.
- Vierstra, R. 1993. Illuminating phytochrome functions. *Plant Physiol.* **103**, 679–684.

- Vierstra, R. and Quail, P. 1983. Photochemistry of 124 kilodalton Avena phytochrome in vitro. *Plant Physiol.* 72, 264–267.
- Vigh, B., Vigh-Teichman, I., Rohlich, P. and Aros, B. 1982. Immunoreactive opsin in the pineal organ of reptiles and birds. Z. mikroskop. Anat. Forsch. 96, 113–119.
- Vince-Prue, D.: 1975. *Photoperiodism in plants*. Mc Graw-Hill Book company, London.
- Virgin, H. 1962. Light-induced unfolding of the grass leaf. *Phaysiol. Plant.* 15, 380–389.
- Vitaterna, M., King, D., Chang, A., Kornhauser, J., Lowrey, P., McDonald, J., Dove, W., Pinto, L., Turek, F. and Takahashi, J. 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719–725.
- Vivien-Roels, B. and Pévet, P. 1986. Melatonin: Presence and formation in invertebrates. *Experientia* 49, 642–647.

Vogelman 1993.

- von Linden n.d.. Effects of light on the molecular feedback oscillator of Neurospora, E274E.
- Wada, M., Takimotot, R. and Tsuyoshi, H. 1992. Annual changes in levels of plasma LH and size of cloacal protrusion in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica) housed in outdoor cages under natural conditions. *General and comp. Endocrinol.* 85, 415–423.
- Wada, Y., Okano, T. and Fukuda, Y. 2000. Phototransduction molecules in the pigeon deep brain photoreceptors in cerebrospinal fluid contacting neurons in pigeon lateral septum. J. comp. Neurology 428, 138–144.
- Waddel, B., Lewis, R. and Engelmann, W. 1990. Localization of the circadian pacemakers of Hemideina thoracica (Orthoptera;

Stenopelmatidae). J. Biol. Rhythms 5, 131–139.

- Wainright 1993. Recent studies have shown, that thread-like fungi are rather closely related to animals.
- Walker, B.: 1949. Periodicity of spawning by the grunion, Leuresthes tenuis, an atherine fish..PhD thesis. University of California. Los Angeles.
- Walker, B.: n.d.. Fish, moon and tides the grunion story. Academy Films, Hollywood, California.
- Wang, H. and Morris, J. 1996. Presence of neuronal nitric oxide synthase in the suprachiasmatic nuclei of mouse and rat. *Neuroscience* 74, 1059–1068.
- Wang, L. and Hudson, J.: 1978. in L. Wang and J. Hudson (eds), Strategies in cold: Natural torpidity and thermogenesis. Academic Press, New York.
- Warmbrodt, R., van der Woude, W. and Smith, W. 1989. Localization of phytochrome in Secale cereale L. by immunogold electron microscopy. *Botan. Gazette* 150, 219–229.
- Wassink, E. and Stolwijk, J. 1953. Effect of photoperiod on vegetative development and tuber formation in two potato varieties. *Meded. Landb. Hoogesch. Wageningen* 53, 99– 112.
- Wayne, N., Nick, T. and Block, G. 1996. Effects of temperature on reproductive neuroendocrine function in Aplysia californica. *General* & Comparative Endocrinology **102**, 351–359.
- Weaver, D. 1997. This system regulates the seasonal timing of reproduction, hibernation, pelage color and other physiological processes.

- Weaver, D. 1998. The suprachiasmatic nucleus: A 25-year retrospective. *Journal of Biological Rhythms* **13**, 100–112.
- Webb, A.: 1998. Stomatal rhythms. Biological rhythms and photoperiodism in plants. Environmental plant biology. Bios Scientific, Oxford. pp. 69–79.
- Webb, W. and Dube, M.: 1981. Temporal characteristics of sleep. in J. Aschoff (ed.), *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. 4. Plenum Press, New York, London. pp. 449– 469.
- Wedekind, J. and Wöhrmann, K.: 1983. Populationsbiologie; Mikro-Computer im Unterricht. Eine Modell-orientierte Einführung.. Eugen Ulmer. Stuttgart. ISBN 3-8001-8640-3.
- Wehner, R. 1998. Der Himmelskompass der Wüstenameisen. Spektrum der Wissenschaft 2, 56–67.
- Wehr, T. 1997. Melatonin and seasonal rhythms. *Journal of Biological Rhythms* **12**, 518–527.
- Wehr, T. 2001. Photoperiodism in humans and other primates: Evidence and implication. J. Biol. Rhythms 16, 348–364.
- Wehr, T. and Goodwin, F.: 1983. *Circadian rhythms in psychiatry*. Boxwood Press, Pacific Grove, California.
- Wehr, T. and Rosenthal, N. 1989. Seasonality and affective illness. Am. J. Psychiatry 146, 829–839.
- Wehr, T., Duncan, W., Sher, L., Aeschbach, D., Schwartz, P., Turner, E., Postolache, T. and Rosenthal, N. 2001. A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder.. Arch. Gen. Psychiatry.

- Wehr, T., Moul, D., Giesen, H., Seidel, J., Barker, C. and Bender, C. 1993. Conservation of photoperiod-responsive mechanisms in humans. Am. J. Physiol. 265, R846–R857.
- Wehr, T., Skwerer, R., Jacobsen, F., Sack, D. and Rosenthal, N. 1987. Eye- versus skinphototherapy of seasonal affective disorder. *Am. J. Psychiatry* 144, 753–757.
- Weinert, D. and Weiss, T. 1997. A nonlinear interrelationship between period length and the amount of activity: Age-dependent changes. *Biological Rhythm Research* 28, 105– 120.
- Weller, A. and Weller, L. 1992. Menstrual synchrony in female couples. *Pseuchoneuroendo*crinology 17, 171–177.
- Weller, A. and Weller, L. 1993. Menstrual synchrony between mothers and daughters and between roommates. *Physiol. Beh* 53, 943– 949.
- Weller, J., Reid, J., Taylor, S. and Murfet, I. 1997. The genetic control of flowering in pea. *Trend Plant Sci.* 2, 412–418.
- Wells, J. 1963. Coral growth and geochronometry. *Nature* **197**, 948–950.
- Welsh, D. and Moore-Ede, M. 1990. Lithium lengthens circadian period in a diurnal primate, Saimiri sciureus. *Biol. Psychol.* 28, 117–126.
- Welsh, D., Logothetis, D., Meister, M. and Reppert, S. 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697–706.
- Went, F. 1926. On growth accelerating substances in the coleoptile of Avena sativa. Proc. K. Akad. Wetensch. Amsterdam 20, 10–19.

- Went, F. 1928. Wuchsstoff und Wachstum. Rec. Trav. Bot. Neerl. 25, 1.
- Went, F.: 1959. The periodic aspect of photoperiodism and thermoperiodicity.. in R. Withrow (ed.), Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. American Ass.Adv.Science Washington D.C.. pp. 551– 564.
- Wever, R. 1964. Ein mathematisches Modell für biologische Schwingungen. Z. Tierpsychol. 21, 359–372.
- Wever, R.: 1979. The circadian system of man. Results of experiments under temporal isolation. Springer New York, Heidelberg, Berlin.
- Wheeler, D., Hamblen-Coyle, M., Dushay, M. and Hall, J. 1993. Behavior in light-dark cycles of Drosophila mutants that are arrhythmic, blind or both. J. Biol. Rhythms 8, 67– 94.

Whitfield 1898.

- Whitmore, D. and Block, G. 1996. Cellular aspects of molluskan biochronometry. Seminars in Cell and Developmental Biology 7, 781–789.
- Wiedenmann, G.: 1978. Eigenschaften von zwei Tagesrhythmen bei Schaben der Arten Leucophaea maderae (Fabricius) und Blaberus fuscus (Burmeister). PhD thesis. University of Tübingen (Germany).
- Wilkins, M. 1960. An endogenous rhythm in the rate of carbon dioxide output of Bryophyllum. II. The effects of light and darkness on the phase and period of the rhythm. J. experimental Botany 11, 269–288.
- Wilkins, M. 1962. An endogenous rhythm in the rate of carbon dioxide output of Bryophyllum III. The effects of temperature on phase and period of the rhythm. *Proc. Royal Soc. London* **156**, 220–241.

- Wilkins, M. 1969. Wilkins 1969, 1992, Queiroz 1974. fig. E098.
- Wilkins, M. 1973. An endogenous circadian rhythm in the rate of carbon dioxide output of Bryophyllum (VI.). J. exp. Botany 24, 488–496.
- Wilkins, M. 1992. Circadian rhythms: Their origin and control.. New Phytologist 121, 347–375.
- Williams, C. 1952. Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the Cecropia silkworm. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, Woods *Hole* **103**, 120–138.
- Williams, C. and Adkisson, P. 1964. Physiology of insect diapause. XIV. An endocrine mechanism for the photoperiodic control of pupal diapause in the oak silkworm, Antheraea pernyi. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* **127**, 511–525.
- Williams, J. and Sehgal, A. 2001. Molecular components of the circadian system in Drosophila. Ann. Rev. Physiol. 63, 729–755.
- Wilson, H. 1992. A critical review of menstrual synchrony research. *Psychoneuroendocri*nology 17, 585–591.
- Winfree, A. 1970. Integrated view of resetting a circadian clock. J. Theor. Biol. 28, 327–374.
- Winfree, A. 1972. Slow dark-adaptation in Drosophila's circadian clock. JCP 77, 418–434.
- Winfree, A. 1976. The morning glory's strange behavior.. *Horticulture* **54**, 42–51.
- Winfree, A.: 1980. The geometry of biological timing. Springer. NY, HD, Berlin. ISBN 0-387-09373-7S.313.
- Winfree, A. 1983. Impact of a circadian clock on the timing of human sleep. American J. Physiology 245, R497–504.

Winfree, A. 1986.

- Winfree, A.: 1987. *The timing of biological clocks*. Scientific American Books, Inc.. New York.
- Winget, C., Hughes, L. and LaDou, J. 1978. Physiological effects of rotational work shifting: A review. J. Occupational Medicine 20, 204–210.
- Winter, K. and Smith, J.: 1996. Crassulacean Acid Metabolism. Biochemsitry, ecophysiology and evolution. Vol. 114 of Ecological studies. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wirz-Justice, A. and Graw, P.: 1999. Lichttherapie. in W. Gaebel and F. Müller-Spahn (eds), Diagnostik und Therapie Psychischer Störungen. Kohlhammer Verlag, Stuttgart. chapter C, 1.3.6.14.
- Wirz-Justice, A., Graw, P., Krauchi, K., Sarrafzadeh, A., English, J., Arendt, J. and Sand, L. 1996. 'Natural' light treatment of seasonal affective disorder. *Journal of Affective Disorders* 37, 109–120.
- Wollnik, F. 1995. Die innere Uhr der Säugetiere. Biologie in unserer Zeit 25, 37–43.
- Wollnik, F. and Turek, F. 1989. SCN lesions abolish ultradian and circadian components of activity rhythm in LEW/ztm rats. Am. J. Physiol. 256, R1027–1039.
- Woodward, D. and Sargent, M.: 1973. Circadian rhythms in Neurospora. in A. Perez-Miravete (ed.), Behaviour of microorganisms. Plenum Press New York. pp. 282–296.
- Woolum, J. 1991. A re-examination of the role of the nucleus in generating the circadian rhythm in Acetabularia.. Journal of Biological Rhythms 6, 129–136.
- Wu, M.-X. and Wedding, R. 1985. Arch. Biochem. Biophys. 240, 655–662.

- Wurts, S. and Edgar, D. 2000. Circadian and homeostatic control of rapid eye movement (REM) sleep: promotion of REM tendency by the suprachiasmaticus. J. Neuroscience 20, 4300–4310.
- Xu, W., Sato, Y. and Yamashita, O. 1995a. Cloning of the diapause hormone gene of the silkworm (Bombyx mori). Acta Genetica Sinica 22, 178–184.
- Xu, W., Sato, Y., Ikeda, M. and Yamashita, O. 1995b. Molecular characterization of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (DH-PHAN) of the silkworm, Bombyx mori and its distribution in some insects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1261, 83–89.
- Yamaoka, S. 1978. Participation of limbichypothalamic structures in circadian rhythm of slow wave sleep and paradoxical sleep in the rat.. Brain Res. 151, 255–268.
- Yamashita, O. 1996. Diapause hormone of the silkworm, Bombyx mori: Structure, gene expression and function. *Journal of Insect Phy*siology 42, 669–679.
- Yamashita, S. and Tateda, H. 1978. Spectral sensitivities of the anterior median eyes of the orb web spiders, Argiope bruennichii and A. amoena. J. exp. Biol. 74, 47–57.
- Yamashita, S. and Tateda, H. 1981. Efferent neural control in the eyes of orb weaving spiders. J. comp. Physiol. A 143, 477–483.
- Yang, Y., Cheng, P., Zhi, G. and Liu, Y. 2001. Identification of a calcium/calmodulindependent protein kinase that phosphorylates the Neurospora circadian clock protein FREQUENCY. J. Biol. Chemistry.
- Yang, Z., Emerson, M., Su, H. and Seghal, A. 1998. Response of the timeless protein to

light correlates with behavioral entrainment and suggests a nonvisual pathway for circadian photoreception. *Neuron* **21**, 215–223.

- Yasuyama, K. and Meinertzhagen, I. 1999. Extraretinal photoreceptors at the compound eye's posterior margin in Drosophila melanogaster. J. comparative Neurology 412, 193– 202.
- Yeung, S. and Eskin, A. 1988. Responses of the circadian system in the Aplysia eye to inhibitors of protein synthesis. *Journal of Biolo*gical Rhythms 3, 225–236.
- Yin, C.-M. and Chippendale, G. 1973. Juvenile hormone regulation of the larval diapause of the southwestern corn borer, Diatraea grandiosella. J. Insect Physiol. 19, 2403–2420.
- Yokoyama, K., Oksche, A., Darden, T. and Farner, D. 1978. The sites of encephalic photoreception in the photoperiodic induction of growth of the testes in the white-crowned sparrow, Z. l. gambelii. *Gen. Comp. Physio*logy **30**, 528–533.
- Young, M. 1998. The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in Drosophila. Annu. Rev. Biochem. 67, 135–152.
- Young, M. and Kay, S. 2001a. Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. Nature Rev. Genet. 2, 702–715.
- Young, M. and Kay, S. 2001b. Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. Nature Reviews Genetics 2, 702–715.
- Youthed, G. and Moran, V. 1969. The lunarday activity rhythm of myrmeleontid larvae. J. Insect Physiol. 15, 1259–1271.
- Zagotta, M., Kicks, K., Jacobs, C., Young, J., Hangarter, R. and Meeks-Wagner, D. 1996.

The Arabidopsis ELF3 gene regulates vegetative morphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J.* **10**, 691–701.

- Zancanaro, C., Malatesta, M., Merigo, F., Benati, D., Fakan, S. and Gazzanelli, G.: 2000. Ultrastructure of organs and tissues of dormice during hibernation. in G. Heldmaier and M. Klingenspro (eds), Life in the cold. Eleventh Int. Hibernation Symposium. Springer Berlin, Heidelberg, New York. pp. 269– 276.
- Zeevaart, J.: 1984. in D. Vince-Prue, B. Thomas and K. Cockshull (eds), Light and the flowering process. Academic Press, Orlando, FLA. pp. 137–142.
- Zeevaart, J. and Marushige, K.: 1967. Biochemical approaches. in S. Imamura (ed.), Physiology of flowering in Pharbitis nil.. Jap. Soc. Plant Physiol. Tokyo. pp. 121–138.
- Zeiger, E., Farquhar, G. and Cowan, I.: 1987. *Stomatal function*. Stanford University Press, Stanford, California.
- Zerr, D., Hall, J., Rosbash, M. and Siwicki, K. 1990. Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of Drosophila.. *Journal of Neuroscience* 10, 2749–62.
- Zhabotinsky, A. 1964. Spontaneously oscillating concentrations. Dokl. Akad.Nauk SSSR 157, 392.

Zhdanova and X 1997.

- Zhong, H. and McClung, C. 1996. The circadian clock gates expression of two Arabidopsis catalase genes to distinct and opposite circadian phases.. *Molecular & General Genetics* 251, 196–203.
- Zimmerman, W., Pittendrigh, C. and Pavlidis, T. 1968. Temperature compensation of

the circadian oscillation in Drosophila pseudoobscura and its entrainment by temperature cycles. J. Insect Physiol. 14, 669–684.

- Zimmermann, U. 1978. Physics of turgor- and osmoregulation. Ann. Rev. Plant Physiol. 29, 121–148.
- Zivkovic, B., Underwood, H. and Siopes, T. 2000. Circadian ovulytory rhythms in Japanese quail: Role of ocular and extraocular pacemekaers. J. Biological Rhythms 15, 172– 183.
- Zucker, I. and Licht, P. 1983. Circannual and seasonal variations in plasma luteinizing hormone levels of ovariectomized ground squirrels (Spermophilus lateralis). *Biol. Reprod.* 28, 178–185.

Zuley, J. 1979.

- Zulley, J. and Knab, B.: 2000. Unsere innere Uhr. Herder Freiburg, Basel, Wien.
- Zulley, J. and Wirz-Justice, A.: 1998. Lichttherapie. 3 edn. Roderer Verlag, Regensburg.
- Zürcher, E. and Cantiani, M.-G. 1998. Tree stem diameters fluctuate with tide. *Nature* 392, 665–666.
- Zwartjes, R. and Eskin, A. 1990. Changes in protein phosphorylation in the eye of Aplysia associated with circadian rhythm regulation by serotonin. *Journal of Neurobiology* 21, 376–384.