

# **Zelluhren**

Wolfgang Engelmann  
Institut für Botanik, Tübingen

Tübingen 2009

Publiziert bei Tobias-lib, Universitätsbibliothek Tübingen:

URL: <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3797/>

Lizenz: <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/doku/lizenzen/xx.html>

2. Auflage 2009

Die erste Auflage erschien 2009 unter <http://www.uni.tuebingen.de/plantphys/bioclox>,  
in der 2. Auflage wurden Text und Bilder überarbeitet

Universitäts-Bibliothek Tübingen. ©Wolfgang Engelmann 2009

Dieses Buch wurde mit LyX geschrieben, einem professionellen System zum Erstellen von Dokumenten (<http://www.lyx.org>). Es verwendet das Textsatzsystem L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X. Die Vektorgrafik-Bilder wurden mit xfig unter Linux angefertigt. Für die Diagramme wurde PyxPlot benutzt. Ich danke Dr. Klaus Reutter, Anatomisches Institut der Universität Tübingen, für die Erlaubnis, einige Bilder seiner Präparate verwenden zu dürfen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cyanobakterien</b>	<b>3</b>
2.1	Circadiane Rhythmen	3
2.2	Luciferase-exprimierende <i>Synechococcus</i>	7
2.3	Mutanten finden	11
2.4	Das Uhrwerk des circadianen Systems	11
2.5	Eingänge zur Uhr	15
2.6	Ausgänge	16
2.7	Adaptive Bedeutung der circadianen Rhythmen von Cyanobakterien	17
<b>3</b>	<b>Rhythmen bei <i>Lingulodinium</i></b>	<b>19</b>
3.1	Circadiane Kontrolle der Biolumineszenz, Mechanismus der Uhr	25
3.2	Bedeutung der Biolumineszenz	27
3.3	Rhythmen der Aggregation, Phototaxis, Vertikalwanderung und Mobilität	28
3.4	Chloroplastenrhythmen	29
3.5	Circadiane Rhythmen in der Photosynthese	29
3.6	Zellteilungsrhythmus	31
3.7	Circadiane Rhythmen im Stoffwechsel und von Enzymen	33
3.8	Wirkung von Substanzen auf den circadianen Rhythmus, Membranen	33
<b>4</b>	<b>Rhythmen bei <i>Acetabularia</i></b>	<b>37</b>
4.1	Tagesrhythmische Phänomene	38
4.2	Rolle des Kerns	38
4.3	Mehrere Oszillatoren?	42
4.4	Interagieren Zellen miteinander?	42
<b>5</b>	<b>Rhythmen bei <i>Chlamydomonas</i></b>	<b>43</b>
5.1	Uhrmechanismus	43
5.2	Photoperiodismus bei <i>Chlamydomonas</i>	44
<b>6</b>	<b>Rhythmen bei Amöben, Hefen und Pilzen</b>	<b>47</b>
6.1	<i>Thalassomyxa</i>	47
6.2	Hefe, Glykolyse-Oszillator	48
6.3	<i>Neurospora</i>	51
6.3.1	Circadiane Rhythmen der Konidienbildung und anderer Vorgänge	53
6.3.2	Zeitgeber und Temperatur-Kompensation	54

## Inhaltsverzeichnis

6.3.3	Die circadiane Uhr von <i>Neurospora</i> . . . . .	56
6.3.4	Ausgänge der Uhr, Uhr-kontrollierte Gene . . . . .	63
<b>7</b>	<b>Rhythmen bei Säuger-Zellen</b>	<b>67</b>
7.1	SCN und seine Ein- und Ausgänge . . . . .	70
7.1.1	Eingänge des SCN . . . . .	74
7.1.2	Ausgänge des SCN . . . . .	74
7.2	Astrocyten . . . . .	80
7.3	Augenuhren . . . . .	82
7.4	Pinealorgan und Melatonin . . . . .	87
7.5	Fibroblasten . . . . .	91
7.6	Intrakardiale Uhr, Cardiomyocyten, Monocyten . . . . .	92
7.7	Nierenzellen . . . . .	94
7.8	Fettzellen . . . . .	95
7.9	Leberzellen . . . . .	100
7.10	Keratocyten . . . . .	101
<b>8</b>	<b>Krankheiten durch circadiane Störungen</b>	<b>105</b>
8.1	Augen, SCN, Blinde Menschen . . . . .	106
8.2	Zellteilungen und Krebs . . . . .	106
8.3	Ernährung, Fettleibigkeit und Diabetes . . . . .	108
8.4	Alkohol und andere Drogen . . . . .	112
8.5	Herz-Kreislauf-Störungen . . . . .	112
8.6	Schlafstörungen, Übergewicht, Depressionen . . . . .	113

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Circadianer Rhythmus der Nitrogenase bei <i>Oscillatoria</i> . . . . .	4
2.3	Circadiane Rhythmen bei <i>Synechococcus</i> . . . . .	4
2.2	<i>Synechococcus elongatus</i> Zellen des Stammes PCCC 7942 . . . . .	5
2.4	Zellteilung bei <i>Synechococcus</i> . . . . .	6
2.5	pH Rhythmen bei <i>Synechococcus</i> . . . . .	7
2.6	Phasen-verschobene <i>Synechococcus</i> -Kulturen . . . . .	8
2.7	Phasenresponsekurve auf Licht bei <i>Synechocystis</i> . . . . .	9
2.8	Temperaturkompensation des circadianen Rhythmus bei <i>Synechococcus</i> . . . . .	10
2.9	Circadianer Rhythmus von <i>Synechococcus</i> -Mutanten . . . . .	12
2.10	Modell der circadianen Uhr von Cyanobakterien . . . . .	13
2.11	Modell der circadianen Gen-Expression von <i>Synechococcus</i> . . . . .	16
2.12	Selektions-Experimente an Cyanobakterien . . . . .	18
3.1	Zelle von <i>Lingulodinium</i> . . . . .	19
3.2	<i>Lingulodinium</i> -Lumineszenz . . . . .	19
3.3	Glimmrhythmus von <i>Lingulodinium</i> . . . . .	21
3.4	Temperaturkompensation des Blitzrhythmus von <i>Lingulodinium</i> . . . . .	22
3.5	Präzision des circadianen Rhythmus bei <i>Lingulodinium</i> . . . . .	23
3.6	Scintillons von <i>Lingulodinium</i> . . . . .	24
3.7	Luciferin von <i>Lingulodinium</i> . . . . .	24
3.8	Licht-Produktion im Scintillon von <i>Lingulodinium</i> . . . . .	26
3.9	Circadiane Synthese des Luciferin-Binde-Proteins von <i>Lingulodinium</i> . . . . .	27
3.10	Unterschiedliche Periodenlängen der Biolumineszenz von <i>Lingulodinium</i> . . . . .	28
3.11	Schwarmbildung bei <i>Lingulodinium</i> . . . . .	29
3.12	A- und B-Oszillator von <i>Lingulodinium</i> und Lichtqualität . . . . .	29
3.13	Unterschiede in der Anordnung der Thylakoide bei <i>Lingulodinium</i> . . . . .	30
3.14	Ursachen des Photosynthese-Rhythmus bei <i>Lingulodinium</i> . . . . .	30
3.15	Photosyntheserhythmus bei <i>Lingulodinium</i> . . . . .	31
3.16	Photosyntheserhythmus einer einzelnen <i>Lingulodinium</i> -Zelle . . . . .	32
3.17	Circadianer Rhythmus der Zellteilung von <i>Lingulodinium</i> . . . . .	32
3.18	Circadianer Rhythmus von Enzymen des Trikarbonsäure-Zyklus . . . . .	34
3.19	Circadianer Rhythmus von Enzymen bei <i>Lingulodinium</i> . . . . .	34
4.1	Schirmalge <i>Acetabularia</i> . . . . .	37
4.2	Sauerstoff-Rhythmus in kernlosen <i>Acetabularia</i> . . . . .	39
4.3	Pfropfexperimente an <i>Acetabularia</i> . . . . .	39
4.4	Translationsmodell des circadianen Rhythmus von <i>Acetabularia</i> . . . . .	40

## Abbildungsverzeichnis

4.5	Temperaturkompensation des circadianen Rhythmus von <i>Acetabularia</i>	41
4.6	Circadiane Chloroplastenwanderung in einer <i>Acetabularia</i>	41
5.1	<i>Chlamydomonas</i> -Zelle	43
5.2	UV-Empfindlichkeit von <i>Chlamydomonas</i>	44
5.3	Keimung von <i>Chlamydomonas</i> in verschiedenen Tageslängen	45
6.1	Formänderung bei <i>Thalassomyxa</i>	47
6.3	Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert nicht <i>Thalassomyxa</i>	48
6.4	Kombinierte Zeitgeber synchronisieren <i>Thalassomyxa</i>	49
6.5	Verlauf der Glykolyse bei Hefe	49
6.2	Formänderung von <i>Thalassomyxa</i> hängt von der Temperatur ab	50
6.6	Induktion der Glykolyse-Oszillation bei einer Hefesuspension	51
6.7	Zellteilung in <i>Saccharomyces</i> Kulturen	52
6.8	Rhythmische CO <sub>2</sub> Bildung in <i>Schizosaccharomyces</i> Kulturen	53
6.11	Circadiane Rhythmen in Flüssigkulturen von <i>Neurospora</i>	54
6.9	Entwicklungszyklus und Generationswechsel von <i>Neurospora</i>	55
6.10	Konidienbildung an Lufthyphen von <i>Neurospora</i>	55
6.12	Molekularer Rückkopplungs-Oszillator nach Goodwin	57
6.13	Modell des Rückkopplungs-Oszillators von <i>Neurospora</i>	58
6.14	Licht und <i>vivid</i> -Gen von <i>Neurospora</i>	59
6.15	Zurücksetzen der Uhr von <i>Neurospora</i> mit Temperaturstufen	61
6.16	Modell von Lakin-Thomas	62
6.17	Maxima der mRNA verschiedener Uhr-kontrollierter Gene von <i>Neurospora</i>	64
7.1	Circadiane Rhythmen in Zellen von verschiedenen Organen	68
7.2	Zentraluhr im SCN, periphere Uhren im Körper	68
7.4	SCN-Implantation stellt circadianen Rhythmus wieder her	70
7.3	Auge-SCN-Pinealorgan	71
7.5	SCN-Struktur und Funktion	75
7.6	Circadiane Kontrolle der Zielzellen durch SCN Uhren-Neuronen	76
7.7	Anatomie der SCN-Umgebung	77
7.8	Astrocyten mit sternförmigen Ausläufern	80
7.10	Circadianer Rhythmus der CAP Amplitude und Frequenz	83
7.9	Auge von <i>Bulla</i>	83
7.11	Wirbeltierauge	85
7.12	Netzhaut des Auges	86
7.13	Visuelle Wege von den Augen zum Gehirn beim Hamster	87
7.14	Signalkaskade zur Synchronisation von Hamstern	88
7.15	Melatoninwirkung auf circadianen Rhythmus	89
7.16	Abstammung der Pinealocyten und retinalen Photorezeptoren	91
7.17	Monozyte	93
7.18	Circadianer Rhythmus von Monocyten	94
7.19	Fettzellen aus dem Fettgewebe	95

## Abbildungsverzeichnis

7.20	Insulin, Fettzellen und Fettsäuren . . . . .	96
7.21	Fettzellen produzieren Adipocytokine . . . . .	96
7.22	Leberzellen . . . . .	100
7.23	Circadianer Rhythmus eines Keratocyten . . . . .	102
7.24	Keratocyt . . . . .	103
8.1	Störungen im circadianen System und Krankheiten . . . . .	107
8.2	Tumoren und Zellzyklus-Störungen . . . . .	107
8.3	Stoffwechsel-Vorgänge bei der Ratte . . . . .	110
8.4	Was regelmäßige Esszeiten für die Gesundheit bedeuten . . . . .	110

## *Abbildungsverzeichnis*

# 1 Einleitung

Rhythmische Vorgänge sind in der Natur weit verbreitet. Wer sich über solche bei Lebewesen informieren möchte, sei auf folgende Bücher verwiesen, die ich geschrieben habe. Dort sind weitere Literaturangaben zu finden: *Rhythmen des Lebens*: Engelmann (2007), *Wie Pflanzen wachsen und sich bewegen*: Engelmann (2004c), *Blumenuhren, Zeitgedächtnis und Zeitvergesen*: Engelmann (2008a), *Fliegende Uhren - Die Uhren von Drosophila*: Engelmann (2009b), *Biokalender - Das Jahr im Leben der Pflanzen und Tiere* Engelmann (2009a), *Uhren, die nach dem Mond gehen - Einfluss des Mondes auf die Erde und ihre Lebewesen* Engelmann (2009c), *Rhythmen in Strukturen von Pflanzen*: Engelmann (2004a), *Wie man eine biologische Uhr stoppen kann: Singularitätspunkt*: Engelmann (2004b), *Unsere inneren Uhren - Biologische Zeitmessung bei Menschen und anderen Säugern*: Engelmann (2008b)

In diesem Buch sollen Rhythmen in Zellen vorgestellt werden. Zellen sind die Grundeinheiten der Lebewesen. Einzeller bestehen nur aus einer einzigen Zelle, bei Vielzellern bilden mehrere oder viele Zellen eine funktionelle Einheit. Während Einzeller alle Aufgaben in dieser einen Zelle bewältigen müssen (zum Beispiel Nahrungsaufnahme, Bewegung, Fortpflanzung), haben sich die meisten Zellen der Vielzeller auf bestimmte Aufgaben spezialisiert und ihre Selbständigkeit verloren. Diese verschiedenen Zelltypen bilden Gewebe und Organe. Zellen können unterschiedlich groß sein. Norma-

lerweise sind sie zwischen 1 und 30 Mikrometer groß, aber eine Schirmalge (siehe Abbildung 4.1) wird einige Zentimeter groß, die Eizelle eines Straußes sogar über 7 Zentimeter. Die Eizelle des Menschen ist 110 bis 140 Mikrometer groß und die einzige Zelle, die man mit bloßem Auge erkennen kann.

In den ersten vier Kapiteln werden Rhythmen bei Cyanobakterien, der Panzeralge *Lingulodinium*, der Schirmalge *Acetabularia*, und der Grünalge *Chlamydomonas* vorgestellt. Die Periodenlänge dieser Rhythmen beträgt im Tagesrhythmus genau 24 Stunden, unter sogenannten Freilaufbedingungen<sup>1</sup> etwa 24 Stunden. Dieser Rhythmus wird circadian<sup>2</sup> genannt. Circadiane Rhythmen werden durch Zeitgeber auf den 24-Stunden-Takt des Tages synchronisiert und ihre Periodenlänge ist innerhalb des normalen Temperaturbereichs ziemlich ähnlich.

Dann folgt Kapitel 6, in dem wir den etwas ungewöhnlichen Rhythmus einer marinen Myxamöbe kennen lernen. Er erinnert bei einer Temperatur von 20° Celsius an einen circadianen Rhythmus, aber bei höheren Temperaturen ist er viel kürzer und bei niedrigeren viel länger. Er lässt sich auch nicht ohne weiteres auf den Takt des Tages synchronisieren. In diesem Kapitel wird auch auf eine Hefe *Schizosaccharomyces* eingegangen, die einen viel kürze-

<sup>1</sup>zum Beispiel Dauerlicht oder Dauerdunkel, konstante Temperatur. Es gibt keine anderen Zeitgeber, die Informationen über die Tageslänge geben können

<sup>2</sup>von *circa*, lateinisch etwa, und *dies*, lateinisch Tag

## 1 Einleitung

ren Rhythmus als den circadianen zeigt. Man nennt solche Rhythmen ultradian<sup>3</sup>. Diese Schwingung ist aber wie die circadiane Temperatur-kompensiert, hat also bei verschiedenen Temperaturen die gleiche Periodenlänge und unterscheidet sich dadurch von normalen ultradianen Rhythmen.

Als nächstes sehen wir uns circadiane Rhythmen bei einem Pilz, dem roten Brotschimmel *Neurospora crassa* an. Dieser Schimmelpilz bildet ein schlauchförmig verzweigtes System mit zahlreichen Kernen, aber keinen Zellwänden. Man nennt das Syncytium. Es ist also eine Art Riesenzelle. An diesem Pilz wurden zahlreiche molekular-biologische Untersuchungen durchgeführt. Dadurch ist der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr recht gut bekannt. Wir könnten uns weiterhin bei verschiedenen tierischen Einzellern wie dem Pantoffeltierchen *Paramecium*, *Tetrahymena pyriformis* und *Acanthamoeba* sowohl circadiane als auch ultradiane Rhythmen ansehen. Vielleicht füge ich das einer späteren Auflage bei.

Schließlich folgt Kapitel 7 über Tagesrhythmen im SCN der Säuger, über Augenuhren, Oszillatoren im Pinealorgan, in Fibroblasten und anderen Zellen von Säuger-Geweben und -Organen. In ihnen werden unter anderem Prozesse wie Glukosetransport, Glukoneogenese, Lipolyse, Adipogenese und oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien durch circadiane Uhren kontrolliert.

Wenn die zeitliche Steuerung der Gewebe und/oder Organe gestört ist, wenn die Zeiten der Nahrungsaufnahme, der Aktivität und des Schlafes geändert sind, kann es zu Krankheiten des Menschen wie Schlafstörungen, Diabetes und Fettleibig-

keit kommen. Es ist deshalb wichtig, die Synchronisation dieser Gewebuehren zu verstehen (Kohsaka and Bass (2007)). Darüber wird Kapitel 8 an einigen Beispielen Auskunft geben.

---

<sup>3</sup>ultra lateinisch unter(halb). dies Tag

## 2 Cyanobakterien

*Prokaryonten besitzen circadiane Rhythmen. Sie äußern sich zum Beispiel bei der Photosynthese, der Stickstoff-Fixierung, der Kohlehydratsynthese und der Zellteilung. Ein Luciferase-exprimierendes Reporter gen wurde in das Chromosom eingefügt, sodass der durch die circadiane Uhr gesteuerte Rhythmus durch Biolumineszenz leicht 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. Zeitgeber wie der Licht-Dunkel-Wechsel werden über Rezeptoren aufgenommen und an die Uhr weitergeleitet, um sie mit dem Tag-Nacht-Rhythmus zu synchronisieren.*

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'. Dieser Organismus sollte eine einfache Struktur und Physiologie besitzen. Er sollte leicht zu kultivieren sein und keine Schwierigkeiten machen, damit zu experimentieren. Er sollte genetischen und molekular-biologischen Methoden zugänglich sein. Schließlich sollten die Zeiger der Uhr leicht zu registrieren sein.

Cyanobakterien besitzen alle diese Ei-

genschaften und sind deshalb besonders geeignet für circadiane Untersuchungen. Die Zellen der Prokaryonten sind kleiner, einfacher gebaut und der Stoffwechsel wesentlich unkomplizierter als bei Eukaryonten. Es gibt nur ein ringförmiges Chromosom und das Genom ist kleiner. Die Regulation der Transkription und Translation ist einfacher und besser bekannt als bei Eukaryonten.

In vielen Labors wird molekularbiologisch an *Cyanobacteria* gearbeitet. Durch ihr kleineres Genom eignen sie sich für saturierende Mutagenese der Gene, die für die Funktion der circadianen Uhr nötig sind (Mackey and Golden (2007)). Außerdem ist inzwischen das Genom einiger Cyanobakterien vollständig sequenziert worden (Kaneko et al. (1996), allgemeine Informationen über Prokaryonten in Lengeler and Drews (1998)). Zahlreiche Mutationen im circadianen System wurden gefunden.

### 2.1 Circadiane Rhythmen

Circadiane Rhythmen bei Cyanobakterien wurden zuerst an *Oscillatoria* nachgewiesen (Abbildung 2.1 und Stal and Krumbein (1985a)) und danach intensiv an *Synechococcus*- (siehe Abbildung 2.2) und *Synechocystis*-Arten untersucht. Stickstoff-Fixierung<sup>1</sup> und Photosynthese dieser Cya-

<sup>1</sup>Zahlreiche Cyanobakterien können Luftstickstoff fixieren. Sie spielen eine wichtige Rolle im Stickstoff-Zyklus zwischen Wasser/Boden, Pflanzen, Tieren und der Atmosphäre. Zum Teil

## 2 Cyanobakterien

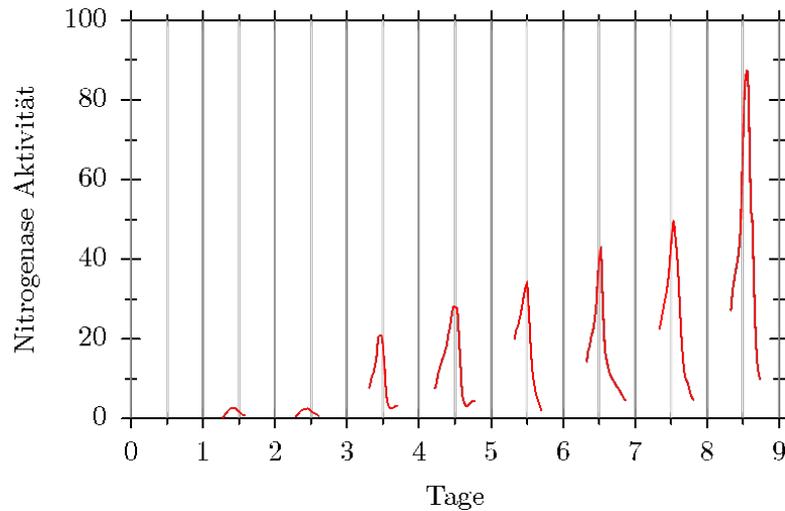


Abbildung 2.1: Die Nitrogenase-Aktivität einer *Oscillatoria*-Art wurde für acht Tage im Dauerlicht bestimmt, wobei die Acetylenreduktion gemessen wurde. Es zeigt sich ein circadianer Rhythmus. Nach [Stal and Krumbein \(1985b\)](#)

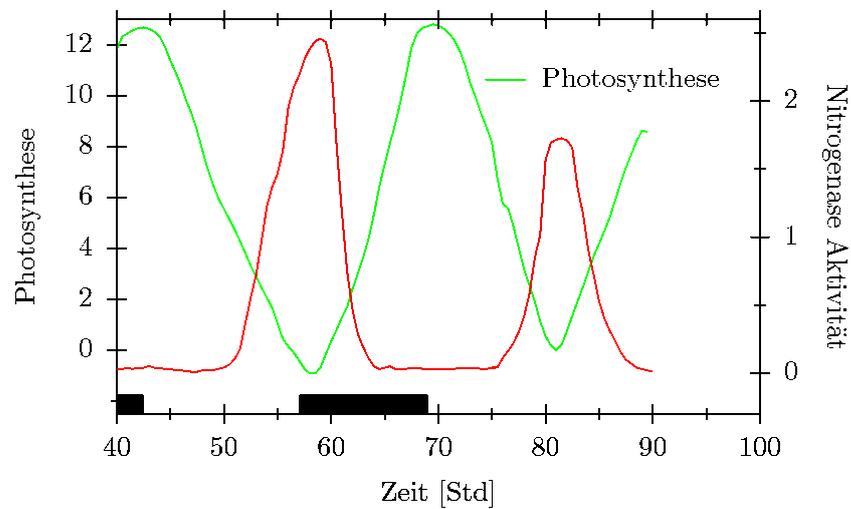


Abbildung 2.3: Circadianer Verlauf der Sauerstoff-Bildung während der Photosynthese (grüne Kurve) und der Stickstoff-Fixierung durch Nitrogenase (rote Kurve) bei *Synechococcus* unter 12:12Std Licht-Dunkel (links, Dunkelperiode: schwarze Balken) und unter Dauerlicht (rechts). Die Nitrogenase-Aktivität ist hoch, wenn die Photosynthese gering ist. Nach [Mitsui et al. \(1986\)](#)

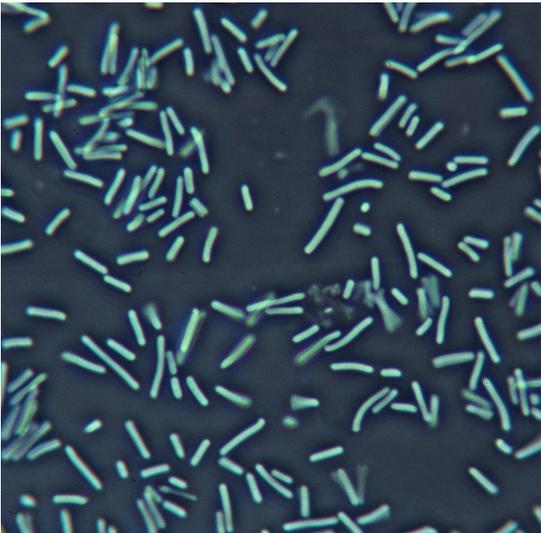


Abbildung 2.2: Zellen von *Synechococcus elongatus* PCC 7942, einer Cyanophyce. Bild freundlicherweise von Takea Kondo, Nagoya Universität Japan, zur Verfügung gestellt

nobakterien verlaufen im Licht-Dunkel-Wechsel so, wie im linken Teil der Abbildung 2.3 (aus Mitsui et al. (1986)) gezeigt ist. Die Nitrogenase-Aktivität ist nachts hoch, wenn keine Photosynthese stattfindet. Das ist verständlich, da das für die Stickstoff-Fixierung verantwortliche Enzym Nitrogenase vom Sauerstoff gehemmt wird, der bei der Photosynthese entsteht. Interessanterweise ist aber auch unter Dauerlicht (rechter Teil der Abbildung 2.3) die Nitrogenase-Aktivität dann hoch, wenn die Photosynthese schwach ist, und zwar zu Zeiten, zu denen eigentlich im Licht-Dunkel-Wechsel Nacht sein würde. Offenbar sorgt bei *Synechococcus* eine circadiane Uhr dafür, dass auch unter Dauerlicht beide Vorgänge

---

trennen aber eine ganze Reihe von Cyanobakterien die Stickstoff-Fixierung von der Photosynthese, indem erstere in besonderen Zellen abläuft, den Heterozysten.

zeitlich voneinander getrennt sind. Auch die Kohlenhydrat-Synthese verläuft unter konstanten Lichtbedingungen (schwaches Dauerlicht) rhythmisch, wird also von einer circadianen Uhr kontrolliert (Mitsui et al. (1986)).

Schließlich steht auch die Zellteilung unter Kontrolle einer circadianen Uhr (Abbildung 2.4 oben). Dabei ergibt sich eine interessante Frage: Viele Cyanobakterien können sich unter optimalen Bedingungen schneller als 24 Stunden teilen. Läuft die circadiane Kontrolle der Teilung trotzdem weiter? Das ist tatsächlich so, wie in Abbildung 2.4 für *Synechococcus* gezeigt. Obwohl sich die Zellen alle 11.8 Stunden verdoppeln, laufen die circadianen Rhythmen weiter.

Ein weiterer Zeiger der circadianen Uhr kann mit einem pH-Meter registriert werden. Der Rhythmus lässt sich aber nur mit besonderer mathematischer Behandlung heraus kitzeln: Das Medium wird von *Synechococcus* circadian angesäuert (Kipert and Lloyd (1995), Abbildung 2.5). Das geschieht stufenweise, wobei die Stufen etwa 24 Stunden Abstand voneinander haben; das Medium wird also immer saurer (in der Abbildung wurde der Trend entfernt und nur die Differenzen aufgetragen). 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. Die Aufnahmeraten schwanken circadian (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 Zeit-

## 2 Cyanobakterien

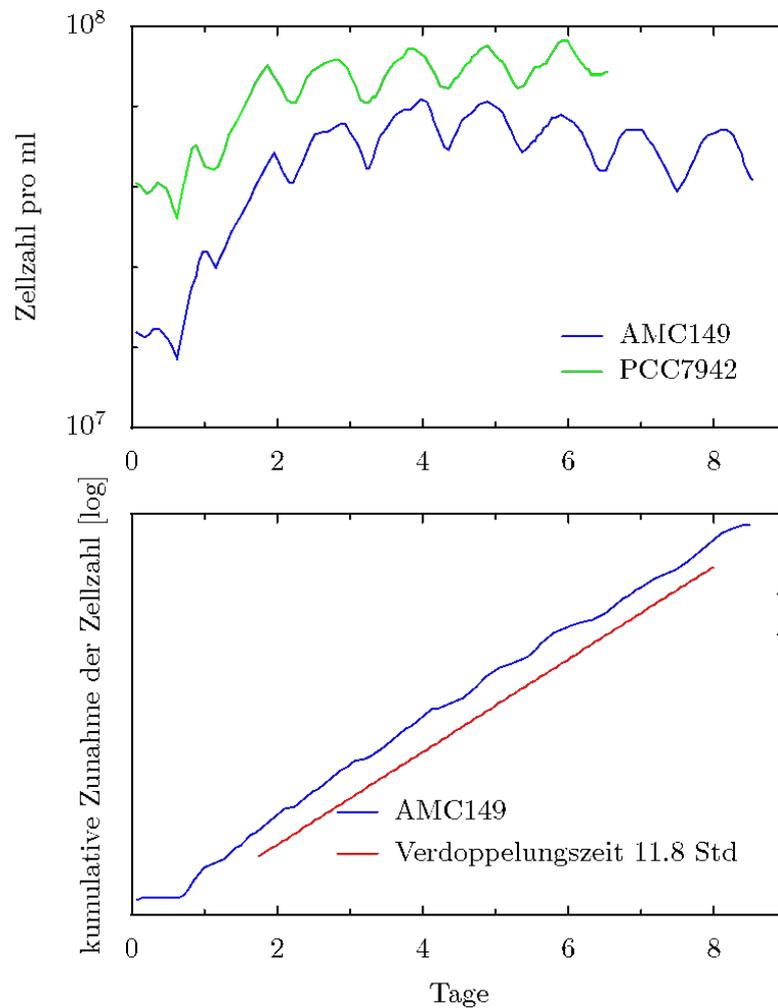


Abbildung 2.4: Zellteilung bei *Synechococcus* PCC7942 (grüne Kurve oberes Diagramm, Periodenlänge 24.0 Stunden) und AMC149 (blau, Periodenlänge 25.2 Stunden). Unteres Diagramm: Blaue Kurve aus dem oberen Diagramm neu dargestellt als kumulative Zunahme der Zellzahl ('logistische Wachstumskurve', aus Verdünnungsrate und Zellzahl berechnet). Rote Kurve: Verdopplungszeit der Zellteilung. Die Kurven zeigen, dass trotz einer Verdopplungszeit von nur 11.8 Stunden die circadianen Rhythmen weiterlaufen (Stufen in der blauen Kurve). Nach Mori et al. (1996)

## 2.2 Luciferase-exprimierende *Synechococcus*

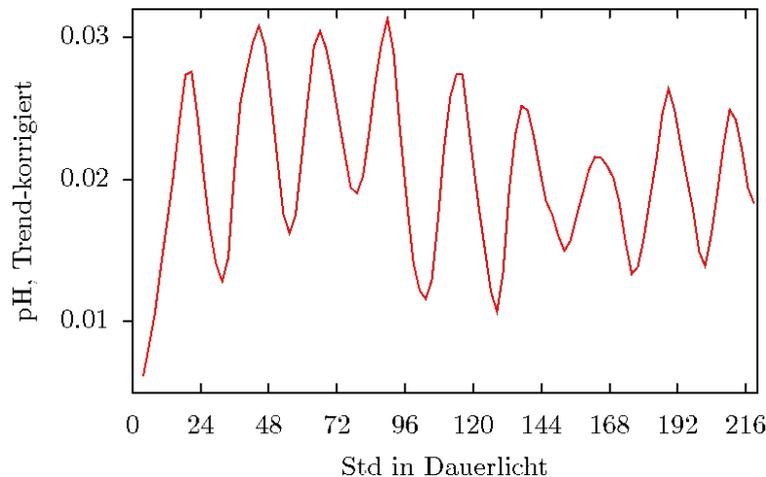


Abbildung 2.5: Der pH des Mediums wird von *Synechococcus circadian* moduliert. Die pH Werte wurden Trend-korrigiert und die Differenzen aufgetragen. Ab Zeitpunkt 0 Dauerlicht, vorher 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel. Nach Kippert and Lloyd (1995)

geber (zum Beispiel einen 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel) synchronisierbar, und sie sind Temperatur-kompensiert (die Periodenlängen hängen nur sehr wenig von der Umgebungstemperatur ab).

## 2.2 Luciferase-exprimierende *Synechococcus*

Könnte man einen guten Zeiger für die circadiane Uhr finden, wären Cyanobakterien wie *Synechococcus* oder *Synechocystis* fast ideale Organismen, um nach Mutanten im circadianen System zu suchen. Die bisher bekannten circadianen Zeiger (voriger Abschnitt) von *Synechococcus* waren jedoch zum Registrieren aufwändig. 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 Promoter (ursprünglich der Promoter des psbA1 Gens, das eine Hauptkomponente

des Reaktionszentrums vom Photosystem II exprimiert; später eine große Zahl anderer Promotoren) wurde ein Reporter-Gen gehängt, das für bakterielle Luciferase kodiert. Auf diese Weise erhielt man tagesperiodisch leuchtende Cyanobakterien (Kondo et al. (1993)). Dadurch kann gleichzeitig bei vielen Populationen der Gang der circadianen Uhr verfolgt werden: Man lässt die Zellen in Petrischalen wachsen und montiert sie auf einer Drehscheibe ('Kondotron', Kondo and Ishiura (1994)). Sie können dann mit einer Licht-empfindlichen Kamera in gleichen Zeitintervallen aufgenommen werden. Golden (2007) benutzten ein Packard Lumimometer, um die Lumineszenz zu messen. Die Bilder werden dann mit einem Bildanalyse-Programm ausgewertet, sodaß die Intensität der Lumineszenz den circadianen Rhythmus widerspiegelt. Mit einem Mikroskop konnten so auch Rhythmen einzelner Zellen von *Synechococcus elongatus* nachgewiesen werden (Mihalcescu et al. (2004)).

## 2 Cyanobakterien

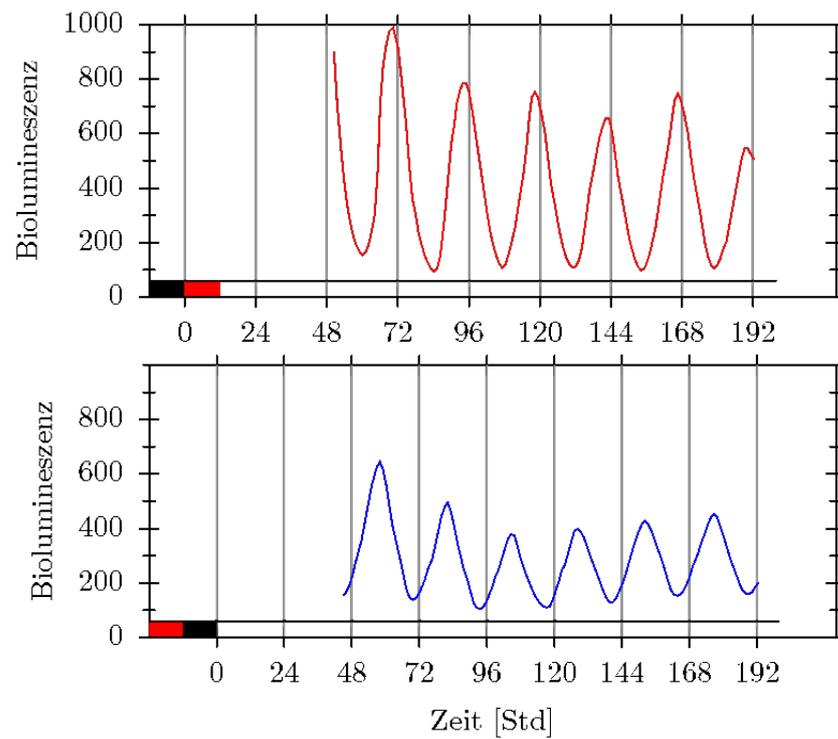


Abbildung 2.6: Zwei Kulturen von *Synechococcus* wurden in gegenläufigen 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechseln bei 30°C so angezogen, dass die eine Kultur (rot) inverts zur anderen Kultur (blau) belichtet wurde. Deshalb kam sie 12 Stunden früher in das Dauerlicht (obere Zeitachse). Die Lumineszenz schwankt in den Kulturen um 12 Stunden Phasen-verschoben. Auch unter konstanten Lichtbedingungen bleibt die Phasenverschiebung des Lumineszenzrhythmus erhalten. Nach [Kondo et al. \(1993\)](#)

## 2.2 Luciferase-exprimierende Synechococcus

Mit diesem neuen Zeiger der circadianen Uhr konnten eine Reihe von wichtigen Fragen geklärt werden. Es wurden zum Beispiel zwei Kulturen in Licht-Dunkel-Wechsels gehalten, die gegeneinander um 12 Stunden phasenverschoben waren (während also die eine Kultur in der Lichtperiode war, befand sich die andere in der Dunkelperiode). Anschließend kamen beide Kulturen in konstante Lichtbedingungen und ihr Lumineszenzrhythmus wurde gemessen. Wie man in Abbildung 2.6) sieht, ist der Rhythmus 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)). Normalerweise würde der Rhythmus im Dunkeln rasch aus-dämpfen, 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 2.7, Aoki et al. (1997)). Mit geeigneten Mutanten könnte 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 über-exprimiert, lässt sich feststellen, ob die von diesen Genen kodierten Moleküle am Transduktionsweg des Lichtes beteiligt sind.

Bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen ist die Periodenlänge des circa-

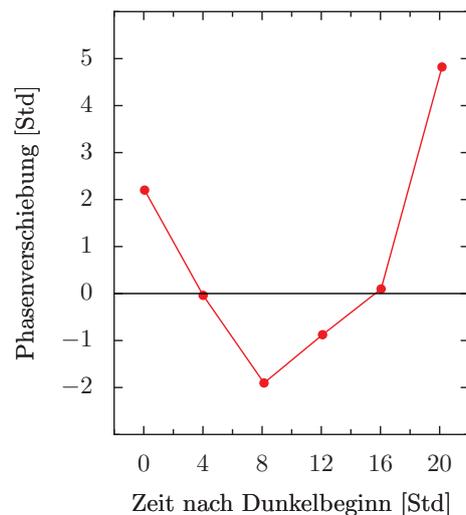


Abbildung 2.7: Lichtpulse verschieben den circadianen Rhythmus der Biolumineszenz von *Synechocystis* im Dauerdunkel je nach dem Zeitpunkt der Applikation unterschiedlich stark. Verfrühungen des Rhythmus oberhalb, Verspätungen unterhalb der Null-Linie. Nach Aoki et al. (1997)

## 2 Cyanobakterien

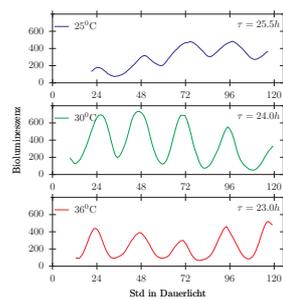


Abbildung 2.8: *Leuchtrhythmus transgener Synechococcus Kulturen im Dauerlicht* (nach 12:12 stündigem Licht-Dunkel-Wechsel) bei unterschiedlichen Temperaturen des Seewassers (obere Kurve: 25<sup>0</sup> C, mittlere Kurve: 30<sup>0</sup> C, untere Kurve: 36<sup>0</sup> C). Obwohl die Amplituden bei niedrigeren und höheren Temperaturen geringer sind, unterscheiden sich die zugehörigen Periodenlängen (25.5, 24.0 und 23.0 Stunden) nur wenig. Der Biolumineszenz-Rhythmus ist demnach Temperatur-kompensiert. Nach [Kondo et al. \(1993\)](#)

dianen Oszillators von *Synechococcus* fast gleich (Kondo et al. (1993), Sweeney and Borgese (1989)). Die circadiane Uhr dieses Cyanobakteriums ist also Temperaturkompensiert (Abbildung 2.8). Der  $Q_{10}$ -Wert liegt bei 1.1 und damit in einem Bereich, der für Tagesrhythmen von Eukaryonten charakteristisch ist.

### 2.3 Mutanten finden

Um Uhr-Mutanten zu finden, muss zweierlei getan werden: Mutationen müssen induziert werden, indem die Cyanobakterien mit einer mutagenen Substanz behandelt und Kolonien vieler behandelter Einzelzellen auf Agarplatten angezogen werden. Zweitens muss der circadiane Rhythmus gemessen werden. Dazu wurde die Biolumineszenz (siehe Abschnitt 2.2) 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 2.9).

### 2.4 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.

Ursprünglich wurde vermutet, dass so ähnlich wie bei den circadianen Uhren

der Pflanzen, Pilze und Tiere das circadiane System der Cyanobakterien aus einem negativen Rückkopplungskreis besteht, in dem die Produkte der Gene *kaiA*, *kaiB* und *kaiC* die Transkription dieser Gene hemmen (Ishiura et al. (1998), Golden (2007)). Es zeigte sich jedoch, dass die Kai Proteine selbst die circadiane Uhr bilden, die auch ohne Transkription und Translation funktioniert (Xu et al. (2003), Nakajima et al. (2005)).

Der molekulare Uhr-Mechanismus ist in Abbildung 2.10 dargestellt (Ivleva et al. (2005), Iwasaki and Kondo (2004), Golden and Canales (2003), Akiyama et al. (2008)). Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von KaiC läuft auch *in vitro* mit einer 24 stündigen Periode ohne Dämpfung für mindestens drei Zyklen ab<sup>2</sup>, wenn die Kai-Proteine und ATP vorhanden sind. KaiA bewirkt, dass KaiC autophosphoryliert. KaiB unterbindet das, so dass KaiC autodephosphoryliert. Die KaiC Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist die molekulare Uhr des circadianen Systems von *Synechocystis*. Es sind also die Kai-Proteine und nicht die *kai*-Promotoren, die den circadianen Rhythmus im Stoffwechsel und in der Physiologie produzieren<sup>3</sup>. Die molekulare Struktur der drei Kai-Proteine ist bekannt, ebenso ihre dynamische Interaktion. Allerdings sind nach Untersuchungen von Kitayama et al. (2008) auch Transkription und Translation für das Zustandekommen des Rhythmus wichtig: Bei niedriger Temperatur ist der circadiane Rhythmus nur vorhanden, wenn der Phosphorylierungszyklus

<sup>2</sup>und kann mit *small angle x-ray scattering* und *low resolution shapes* der KaiA-KaiC bzw KaiB-KaiC gemessen werden (Akiyama et al. (2008))

<sup>3</sup>sogar ein *Escherichia coli* Promoter funktioniert, wenn er genügend RNA Polymerase Aktivität besitzt

## 2 Cyanobakterien

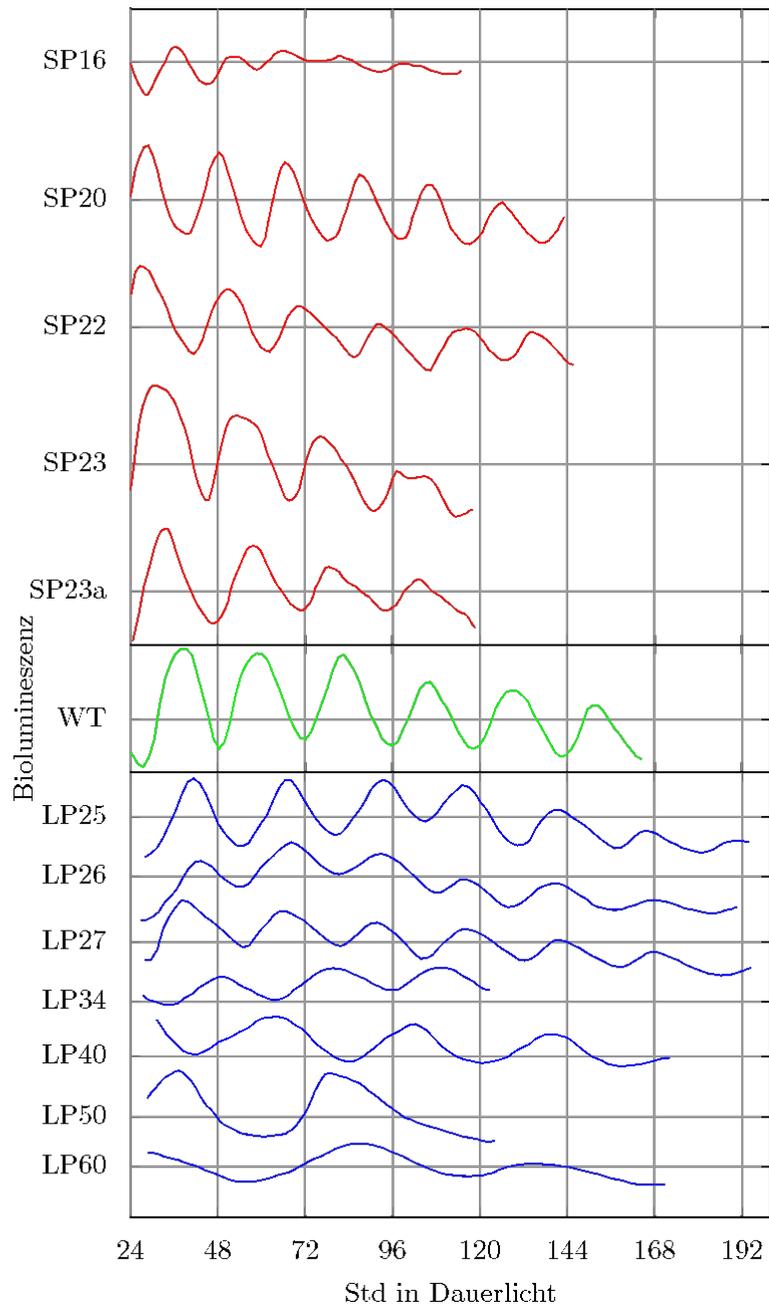


Abbildung 2.9: Circadianer Rhythmus der Biolumineszenz transgener *Synechococcus Cyanobakterien* ('Wildtyp', grüne Kurve) und von Mutanten mit unterschiedlichen Periodenlängen (von 16 bis 60 Stunden Länge; rote Kurven kürzere, blaue Kurven längere Perioden als Wildtyp). Nach Kondo et al. (1994)

## 2.4 Das Uhrwerk des circadianen Systems

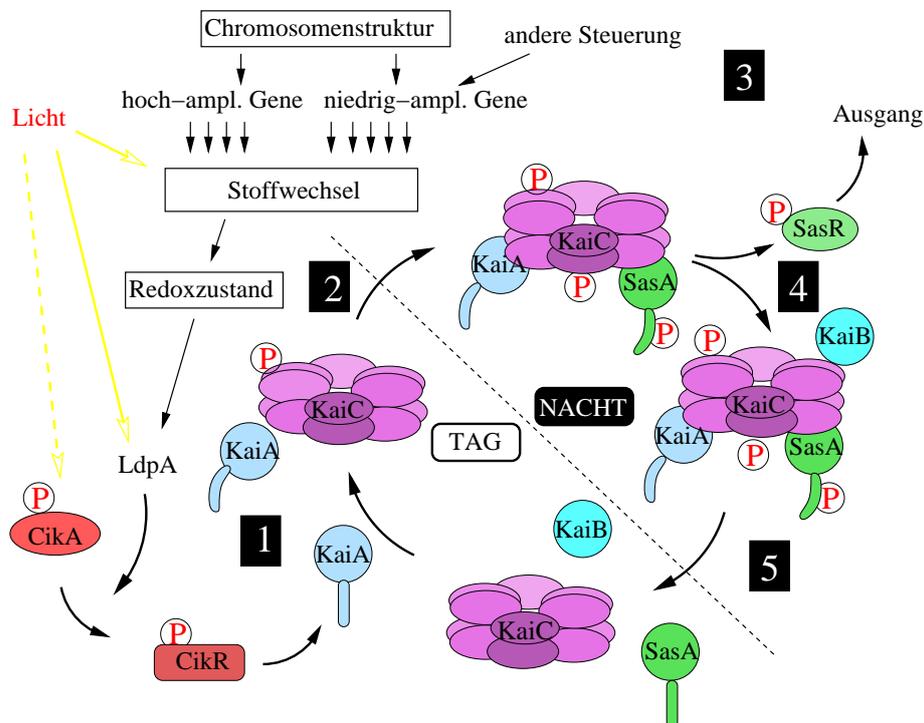


Abbildung 2.10: Modell der circadianen Uhr von Cyanobakterien: 1: Licht beeinflusst den Stoffwechsel und über Plastoquinon (im Starklicht reduziert, im Schwachlicht oder in Dunkelheit oxidiert) den Redox-Zustand (alternativ wird Licht durch LdpA direkt und/oder durch CikA perzipiert). Eine Signalkette LdpA/CikA/CikR beeinflusst die Empfänger-Domäne (gerader Schwanz) des KaiA, die mit KaiC interagiert und seine Autophosphorylierung und Hexamer-Bildung stimuliert. 2: Am frühen Abend verbindet sich SasA mit dem KaiA/KaiC Komplex und KaiC stimuliert die Phosphorylierung von SasA. Seine Phosphat-Gruppe wird auf den Respons-Regulator SasR übertragen. 3: SasR und andere Proteine im Ausgang übertragen die Zeit-Informationen vom Oszillator (dem KaiA/KaiB/KaiC-Komplex) auf das Genom, indem die Chromosomen-Struktur (oberster Kasten) und der Stoffwechsel (darunter) über hochamplitudig- und niedrigamplitudig exprimierende Gene (und andere Regulationen) beeinflusst wird. 4: Am späten Abend bindet KaiB an KaiC und dephosphoryliert es. Konformationsänderungen von KaiA und SasA durch Signal-Übertragung sind durch gerade oder gekrümmte Schwänze der Symbole angedeutet. Nach [Golden and Canales \(2003\)](#) und persönliche Mitteilung von Takao Kondo, Nagoya Universität

## 2 Cyanobakterien

von KaiC *und* Transkription/Translation in Takt sind. Ferner ist KaiC auch in KaiA-überexprimierenden Mutanten und solchen ohne Phosphorylierung rhythmisch. Für einen robusten und präzisen Rhythmus ist also ein multiples gekoppeltes System zuständig, das auf den biochemischen Eigenschaften von KaiC beruht (Brunner et al. (2008)).

A-Schleifen (A-loops) des C-Endes von KaiC sind die Schalter, die für die KaiC-Aktivität verantwortlich sind. Im verborgenen Zustand ist dann die Autophosphatase, im offenen die Autokinase des KaiC wirksam. Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Zuständen bestimmt das Gleichgewicht. KaiA stabilisiert den exponierten Zustand der A-Schleifen durch direkte Bindung. Ohne diese Bindung und Stabilisierung ist KaiC unterphosphoryliert. KaiA und KaiB verschieben also das dynamische Gleichgewicht der A-loops zwischen einem exponierten und einem verborgenen Zustand, womit KaiC entweder als Autokinase oder als Autophosphorylase aktiv ist. Die exponierten A-Schleifen bringen ATP näher an die Phosphorylierungsstellen. Einzelheiten zum vorgeschlagenen Mechanismus in Kim et al. (2008), Brunner et al. (2008). Die ATPase Aktivität von KaiC ist übrigens extrem schwach (Dong and Golden (2008)).

Die Periodenlänge wird vor allem durch KaiC bestimmt, da Perioden-Mutanten bestimmte Aminosäure-Substitutionen im KaiC Protein aufweisen. Die Perioden dieser Mutanten reichen von 14 bis zu 60 Stunden. Mit ATP bildet KaiC ein Homohexamer (das sich unterm Elektronenmikroskop beobachten lässt (Mori et al. (2002))). Eine langperiodische Mutante kaiA1 verstärkt die Interaktion der Kai Proteine. Die biochemische Funktion

der Kai Proteine ist unbekannt. KaiC besitzt zwei ATP/GTP Bindungsdomänen, die bei der Rhythmusbildung eine wichtige Rolle spielen (Nishiwaki et al. (2000)). Die Histidinkinase SasA interagiert mit KaiC und ist für einen robusten circadianen Rhythmus nötig (Iwasaki et al. (2000)).

Diese einfache Proteinuhr erklärt auch, warum und wie ein circadianer Zeitmessvorgang bei Cyanobakterien auch bei Generationszeiten von acht Stunden oder weniger funktionieren kann (Kondo et al. (1997)) und wie die Teilung trotzdem noch durch die circadiane Uhr gesteuert werden kann (Mori et al. (1996)).

Der circadiane Oszillator steuert den gesamten Stoffwechsel und beruht auf der Integration des zellulären Stoffwechsels (Nakahira et al. (2004)). Die umfangreiche circadiane Kontrolle der Genexpression bei *Synechococcus* betrifft mindestens zwei Klassen von Uhr-regulierten Genen: Etwa 80% der getesteten Promotoren sind am Tag aktiv mit einem Maximum am Ende des Tages. In der kleineren Gruppe hat die Expression eine entgegengesetzte Phase und ist abends und in der Nacht maximal, wenn die Chromosomen kompakt sind. Diese Gene könnten zum Beispiel Sauerstoff-empfindliche Enzyme kodieren und funktionieren am besten nachts, wenn keine Photosynthese stattfindet. Ein spezifisches Phasenelement gibt es nicht. Stattdessen scheint die Chromosomen-Dynamik oder DNA Topologie die Phase zu bestimmen (Min et al. (2004)).

Eine wichtige Frage ist, wie dieser Uhrmechanismus eine globale circadiane Genexpression ermöglicht. Die circadiane Uhr scheint auch die Kondensation oder den supercoiling Zustand der Chromosomen zu bestimmen (Nakahira et al. (2004), Thanbichler et al. (2005)) und auf

diese Weise den Zugang zu Promoter-Elementen zu kontrollieren (Smith and Williams (2006)).

Da Cyanobakterien sich so stark von Eukaryonten unterscheiden, fragt sich, ob der circadiane Rhythmus der beiden Gruppen auf dem gleichen Mechanismus beruht. Nach der Endosymbiontenhypothese entstanden Chloroplasten aus Cyanobakterien. Wenn auf diese Weise circadiane Uhren übertragen wurden, sollten die circadianen Systeme der Pflanzen und Cyanobakterien 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.

## 2.5 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 (Aoki et al. (1997)) und Temperatur-Zyklen (Lin et al. (1999)) synchronisieren tatsächlich die *Synechocystis*-Uhr. Ein dreistündiger Lichtpuls im Dauerdunkel gegeben verschiebt den Rhythmus zu früheren oder späteren Zeiten in unterschiedlicher Stärke je nach dem Zeitpunkt, zu dem er gegeben

wurde. Daraus konnte ein Aktionsspektrum für die Phasenverschiebung erstellt werden (Inouye et al. (1998)). Rotes und blaues Licht sind am wirksamsten (Kaneke et al. (1996)). Licht synchronisiert wahrscheinlich über den Redox-Zustand im Stoffwechsel, der durch die Photosynthese eingestellt wird: Wenn Plastochinon oxidiert ist, wird LdpA aktiv. Bei höheren Lichtintensitäten wird Plastochinon reduziert und LdpA inaktiviert. LdpA interagiert mit dem Uhr-Protein KaiA (Ivleva et al. (2005), siehe auch Abbildung 2.10). Die Übertragungswege des Lichtes zur Synchronisation der Uhr sind noch nicht bekannt, aber es gibt aus den Genom-Sequenzen einige Kandidaten wie zum Beispiel ein Phytochrom, ein zwei-Komponenten-System und Adenylatcyclase. Auch das Bakteriophytochrom CikA (circadian input kinase, eine Histidin-Proteinkinase) scheint ein Weg des Lichtsignals zum Oszillator zu sein (Schmitz et al. (2000)), möglicherweise ein Redox-Sensor (Golden (2007)). Es ist für Phasenverschiebungen wichtig. Die Mutante ist blind für Dunkelpulse. Außerdem wurde ein Bakterien-Cryptochrom gefunden (Hitomi et al. (2000)). Einige Gene, die an der Photosynthese von *Synechococcus* und *Synechocystis* beteiligt sind, werden durch Licht reguliert (Golden et al. (1995), Kumar et al. (1999)), so zum Beispiel das *rbcL* Gen, das die katalytische Untereinheit des Schlüsselenzyms der lichtabhängigen CO<sub>2</sub>-Fixierung darstellt (Chow and Tabita (1994)). Maximale Stickstoff-Fixierung geschieht während der Nacht, wie bereits erwähnt. In der Dunkelperiode wird Nitrogenase synthetisiert, aber im Licht wird es schnell abgebaut, vielleicht durch eine Protease.

## 2.6 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 ebenfalls erwähnt. Es würde sich lohnen, sie auf eine circadiane Modulation dieser Bewegungen hin zu untersuchen.

Die circadiane Uhr steuert bei Cyanobakterien über Transduktions-Proteine global die Gene, indem die Transkription über den Chromosomenzustand (Compaction) reguliert wird (Golden (2007)). Dabei spielen SasA und RpaA eine Rolle (Dong and Golden (2008), das *Functional Genomic Project* Holtman et al. (2005)). Darüber hinaus müsste es Transfaktoren geben, die für unterschiedliche Phasenlagen und Amplituden sorgen (siehe Abbildung 2.11, siehe aber auch Seite 14).

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)).

1994 war bei mehr als zehn Polypeptiden von *Synechococcus* RF-1 eine circadiane Regulation nachgewiesen (Huang and

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

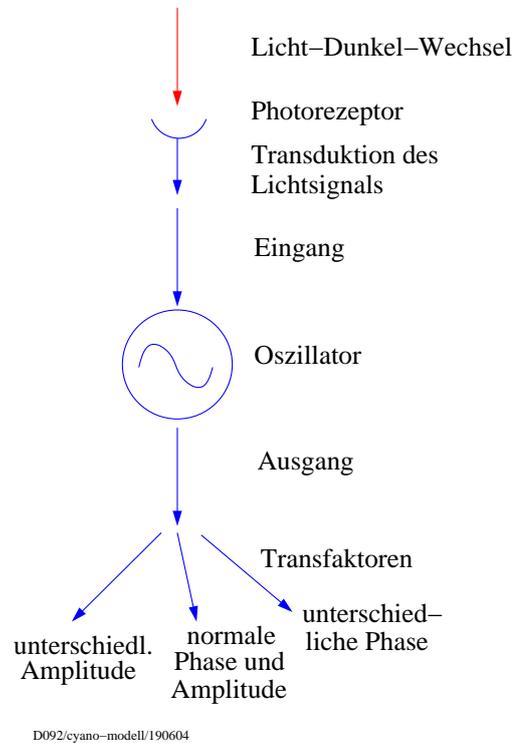


Abbildung 2.11: Modell der circadianen Gen-Expression von *Synechococcus*. Der circadiane Oszillator wird durch Zeitgeber wie den Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert. Ein Ausgang dieses Oszillators beeinflusst die Transkription global (normale Phase und Amplitude). Trans-Faktoren können zusätzlich die Amplitude und Phasenlage des Rhythmus modifizieren. Nach Ishiura et al. (1998)

## 2.7 Adaptive Bedeutung der circadianen Rhythmen von Cyanobakterien

Pen (1994)). Inzwischen sind es weit mehr (Holtman et al. (2005)). 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)).

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. (1998) und Abbildung 2.12).

## 2.7 Adaptive Bedeutung der circadianen Rhythmen von Cyanobakterien

Was ist die adaptive Bedeutung einer circadianen Uhr bei Cyanobakterien? Bei Stickstoff-fixierenden 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-Calvo and Stal (1991), Roenneberg and Carpenter (1993)). Diazotrophe können also ganz verschiedene Mechanismen benutzen, um die Nitrogenase vor Sauerstoff zu schützen (siehe Gallon (1981) und Gallon (1992)).

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),

## 2 Cyanobakterien

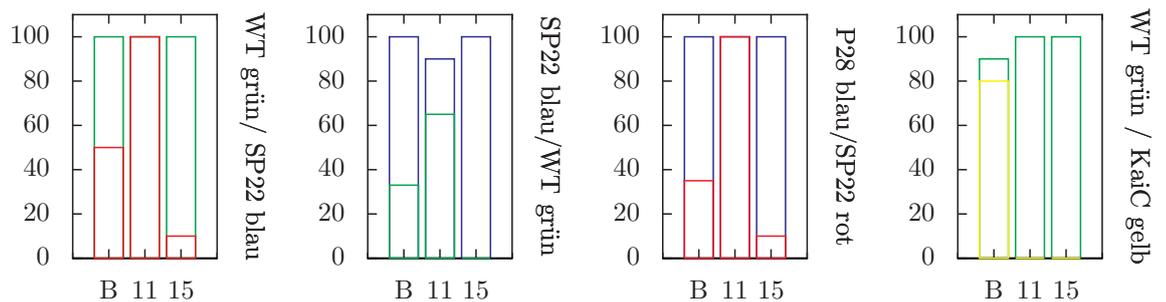


Abbildung 2.12: Selektions-Experimente von [Johnson et al. \(1998\)](#). Links: Mischungen von Wildtyp (Freilaufperiode 24 Stunden) und Perioden-Mutante SP22 (Freilauf-Periode 22 Stunden) im 22- (11:11 Stunden LD) und 30-Stunden-Tagen (15:15 Stunden LD) gehalten. Nach 27 Tagen war im 22-Stunden-Tag der Wildtyp zahlreicher als die Mutante. Im 30-Stunden-Tag hatte die Mutante den Wildtyp fast völlig verdrängt. Daneben: Mutante P28 (Freilaufperiode 28 Stunden) hat im 30-Stunden-Tag nach 27 Tagen den Wildtyp völlig verdrängt, im 22-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. Rechts: Die arrhythmische Mutante KaiC wird sowohl im 22-Stunden- als auch im 30-Stunden-Tag vom Wildtyp verdrängt. Abszisse: Verhältnis der gemischten Stämme in Prozent. Nach [Johnson et al. \(1998\)](#)

### 3 Rhythmen bei *Lingulodinium*

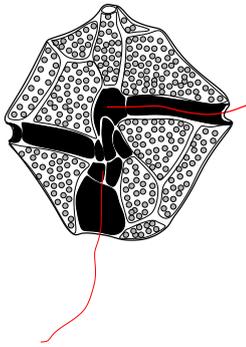


Abbildung 3.1: *Lingulodinium polyedrum* Zelle mit Theka (Zellulosepanzer), einer Quer- und einer Längs-Rinne, in denen sich je eine Geißel befindet. Ventralansicht. Durchmesser 40  $\mu\text{m}$ . Nach Schussnig (1954) und einem elektronenmikroskopischen Bild in Hastings (2006)

Bei der einzelligen Alge *Lingulodinium* wurden einige circadiane Rhythmen untersucht wie zum Beispiel die Biolumineszenz, die Aggregation von Zellen, Zellteilung, und Photosynthese. Stoffwechsel und eine Reihe von Enzymen stehen unter der Kontrolle der circadianen Uhr. Licht synchronisiert diese Rhythmen.

Verschiedene Dinoflagellaten wie zum Beispiel *Lingulodinium* leuchten in der Nacht. Diese Meeresalge gehört zur Abteilung der *Dinophyta* (Panzeralgen), und hier zur Klasse der *Dinophyceae* und zur Ordnung der *Peridiniales*. Die Alge ist 1/20 mm groß und besitzt ein Zelluloseskelett mit einer äquatorialen und einer longitudinalen Rinne (Abbildung 3.1). In jeder Rinne befindet sich eine Geißel, mit der

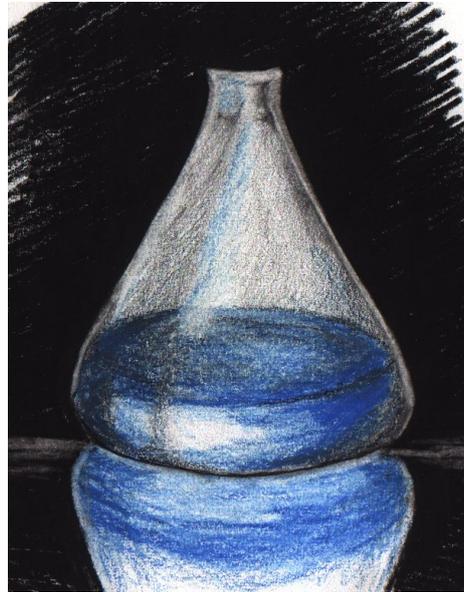


Abbildung 3.2: Die Biolumineszenz einer Flasche mit *Lingulodinium polyedrum* wurde kurz nach Schütteln des Erlenmeyerkolbens auf einer Glasplatte im Dunklen fotografiert. Gezeichnet von Mareike Förster nach Taylor in Hastings (1994)

sich die Algen aufwärts und seitlich fortbewegen können.

Auch unter Laborbedingungen lässt sich die Biolumineszenz beobachten, wenn die Kulturen in Glaskolben angezogen werden (Abbildung 3.2). Im 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel zeigt sich die Biolumineszenz nur nachts<sup>1</sup>. Aber auch unter konstanten Umweltbedin-

<sup>1</sup>während der Lichtperiode muss das Licht für eine kurze Zeit ausgeschaltet werden, um die Biolumineszenz der Kultur zu beobachten.

### 3 Rhythmen bei *Lingulodinium*

gungen leuchten die Kulturen weiterhin rhythmisch. Sie werden also durch eine innere Uhr gesteuert.

Dieser Rhythmus wurde in verschiedenen Laboratorien intensiv untersucht (Übersichten [Sweeney \(1984\)](#), [Hastings \(1959\)](#), [Roenneberg and Rehman \(1998\)](#)). Die Biolumineszenz kann für längere Zeit automatisch und in vielen Gefäßen gleichzeitig registriert werden. Sie besteht aus zwei Phänomenen: einer durch mechanische oder chemische Störungen hervorgerufenen Blitzfolge und einem an ungestörten Kulturen zu beobachtenden viel schwächeren Glimmen (Abbildung 3.3). 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.

Der Biolumineszenzrhythmus ist, wie für circadiane Rhythmen charakteristisch, relativ unabhängig von der Umgebungstemperatur (Abbildung 3.4, [Sweeney and Hastings \(1960\)](#)). Bei höheren Temperaturen geht die Uhr von *Lingulodinium* etwas langsamer, der  $Q_{10}$  (siehe Glossar) beträgt 0.85 ([Hastings and Sweeney \(1957\)](#)). Die Temperaturkompensation lässt sich durch zwei chemische Reaktionen mit gleicher Temperatur-Abhängigkeit erklären, bei denen das eine Reaktionsprodukt die andere Reaktion hemmt. Die Uhr wird auf diese Weise gegen Schwankungen der Umgebungstemperatur gepuffert.

Der Biolumineszenzrhythmus ist sehr präzise. Er kann für die Population auf 2 Minuten pro Tag genau sein (0.015%, Abbildung 3.5). 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 aus dämpft, 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. \(1982\)](#)).

Wie bei den meisten Organismen ist Licht der stärkste Zeitgeber zum Synchronisieren der *Lingulodinium*-Uhr. Licht beeinflusst außerdem die Periodenlänge des Biolumineszenz-Rhythmus. Wie, hängt von der Lichtqualität<sup>2</sup> und der Lichtmenge<sup>3</sup> ab.

Die Biolumineszenz findet in besonderen kugelförmigen Organellen, den Scintillons, statt ([Lapointe and Morse \(2008\)](#)), die in der Nähe der Zellmembran liegen. Während der Lichtperiode gibt es nur etwa 40 Scintillons pro Zelle, während der

<sup>2</sup>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

<sup>3</sup>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.

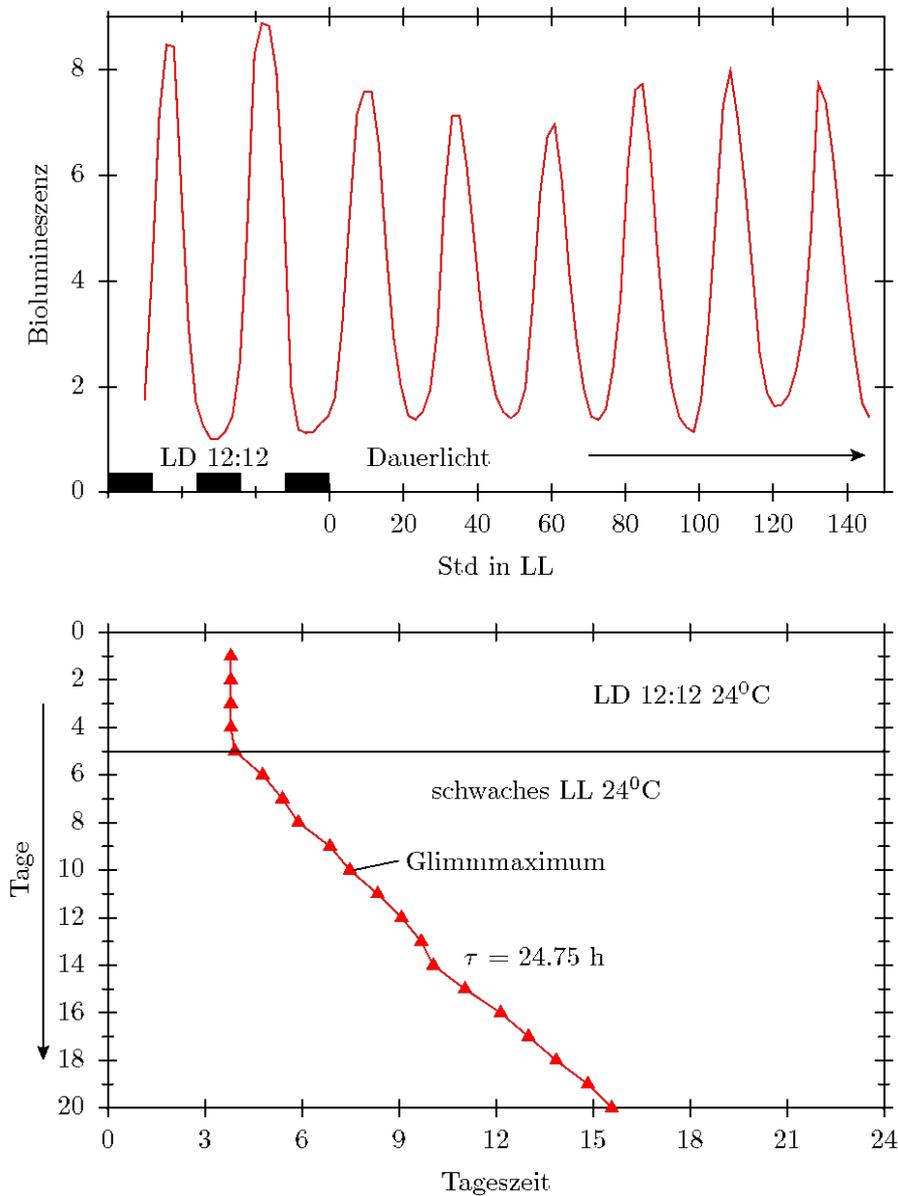


Abbildung 3.3: Obere Kurve: Glimmrhythmus (y-Achse: Biolumineszenz) einer Kultur von *Lingulodinium polyedrum* im 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel (bis zur Stunde 0) und danach im schwachen Dauerlicht. Untere Kurve: Glimmrhythmus einer Kultur von *Lingulodinium polyedrum* bei einer konstanten Temperatur von 24°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 \(1960\)](#)

### 3 Rhythmen bei Lingulodinium

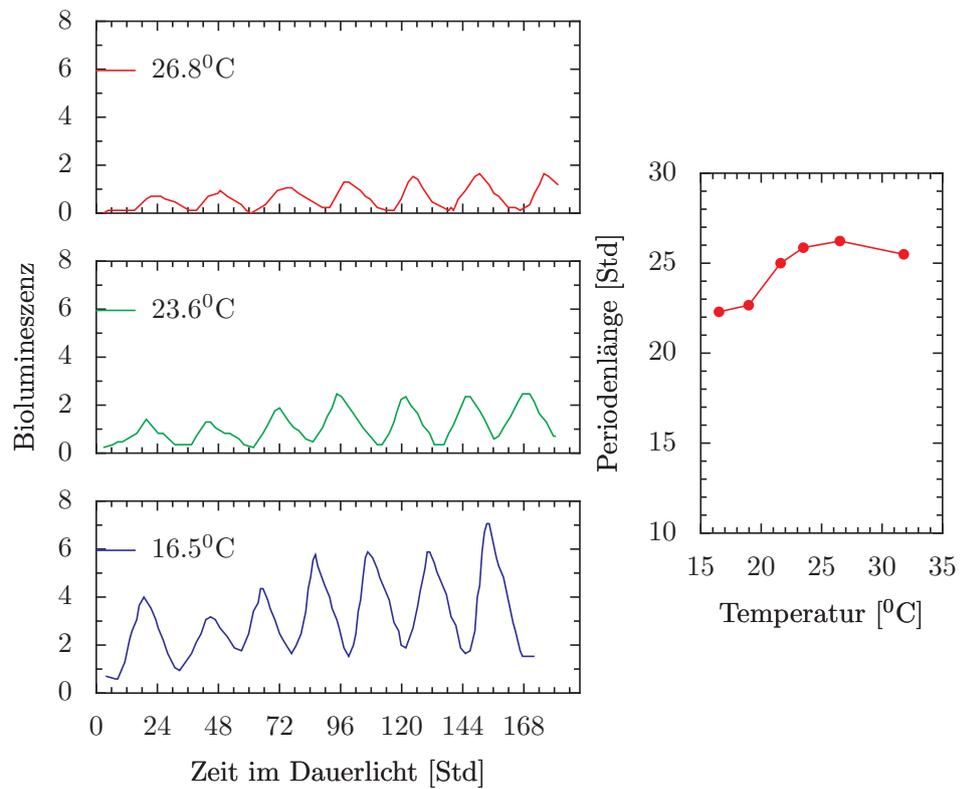


Abbildung 3.4: Die Periodenlänge des Blitzrhythmus von *Lingulodinium polyedrum* ist wenig von der Temperatur des Seewassers abhängig ('Temperatur-kompensiert'): Der Verlauf der Biolumineszenz (im schwachen Dauerlicht) ist bei verschiedenen Temperaturen dargestellt (oberste linke Kurve: 26.8°, mittlere linke Kurve: 23.6°, untere linke Kurve: 16.5°C. 26.8). y-Achse: Lichtintensität. Rechte Kurve: Periodenlänge (in Stunden) des Glimmrhythmus der Biolumineszenz von *Lingulodinium* in Abhängigkeit von der Temperatur des Mediums. Nach *Hastings and Sweeney (1957)*

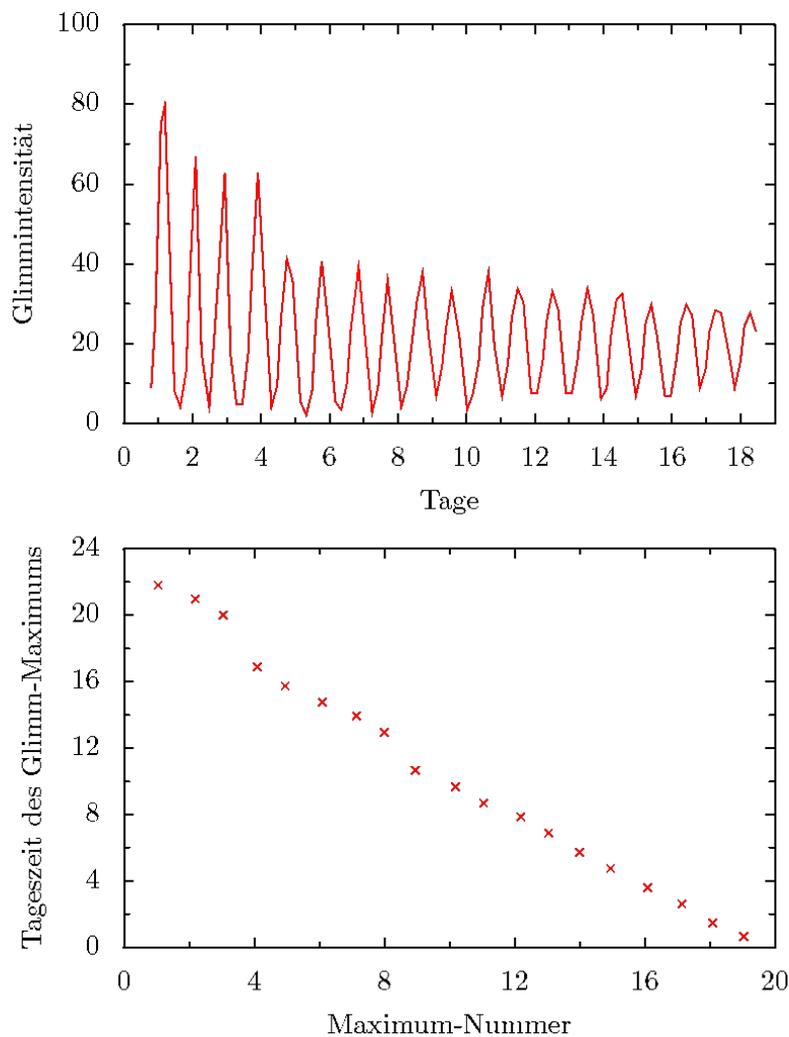


Abbildung 3.5: Der circadiane Glimmrhythmus der Biolumineszenz von *Lingulodinium polyedrum* wurde an einer Kultur bestimmt, die zunächst in einem 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel und einer konstanten Temperatur von  $19^{\circ}\text{C}$  gehalten wurde. Zum Zeitpunkt 0 (x-Achse) wurden die Algen 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. \(1990\)](#)

### 3 Rhythmen bei *Lingulodinium*

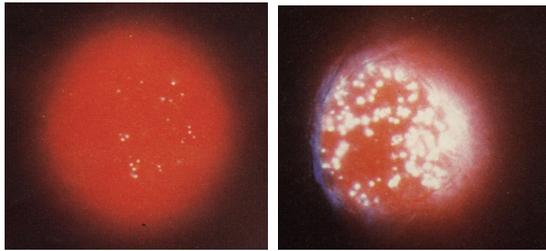


Abbildung 3.6: Scintillons sind Organellen der Biolumineszenz-Produktion bei *Lingulodinium polyedrum*. Nachts enthält eine Zelle etwa 400, Tags nur etwa 40 Scintillons. Sie ragen aus dem Zytoplasma als Blasen des Tonoplasten in die Vakuole. Durchmesser etwa 0.5  $\mu\text{m}$ . Schütteln der Kultur oder andere Reizung der Zellen ruft ein Aktionspotential hervor. Dieses triggert einen  $\text{H}^+$ -Fluss aus der sauren Vakuole in das weniger saure Scintillon. Dadurch wird die Biolumineszenz in Gang gesetzt (siehe Abbildung 3.8)

Nacht etwa 400 (Abbildung 3.6, Fritz et al. (1990), Johnson et al. (1985)). Sie ragen als Taschen in die Vakuole und sind mit dem Cytoskelett verbunden. Die Scintillons lassen sich im Mikroskop als leuchtende Punkte erkennen und 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.

Wie bei allen Biolumineszenz-Vorgängen besteht auch das Leuchten der *Lingulodinium*-Zellen aus einer Reaktion eines Substrates (Luciferin) mit einem Enzym (Luciferase).<sup>4</sup> Es gibt etwa

<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 al-

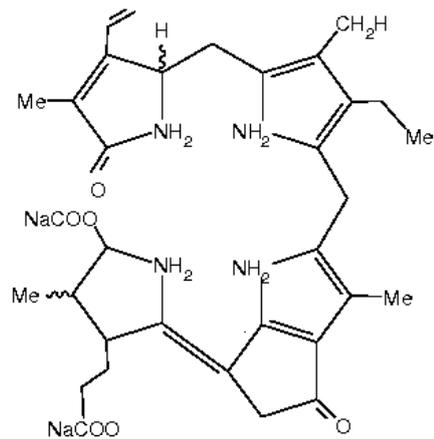
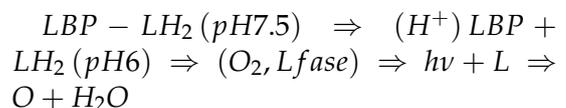


Abbildung 3.7: Tetrapyrrol-Struktur des Luciferins von *Lingulodinium polyedrum*. Me: Methylgruppe. Nach Nakamura et al. (1989)

$2.7 \cdot 10^{12}$  Luciferase-Moleküle pro Zelle. Das Luciferin ist bei *Lingulodinium* ein Tetrapyrrol, ein kleines Molekül (Molekulargewicht  $<1000$ ; Abbildung 3.7). Es ist hitzestabil, während die Luciferase hitzeempfindlich 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 weniger ändert sich die Konfiguration des LBP, das Luciferin wird frei und reagiert mit  $\text{O}_2$  über die Luciferase. Niedriger pH aktiviert auch die Luciferase.



Circadian gesteuert werden die Translation des Luciferin-Bindeproteins, des Luciferins ( $\text{LH}_2$ ) und der Luciferase (Morse et al. (1989)). Die mRNA für LBP ist

len bisher bekannten Luciferasen.

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

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 translationell 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 trans-agierende Faktoren eine Rolle (Mittag (1998)). Diese translationale Kontrolle steht im Gegensatz zu der circadianen Steuerung beim Kreuzblütler *Arabidopsis*, bei dem die *Transkription* circadian geregelt ist.

Translations-kontrollierte regulatorische Uhr-Proteine (CP1, CP2, CP3) wurden als Bestandteile des circadianen Mechanismus vorgeschlagen. 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 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 der Luciferase

circadian, oder beides.

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 3.8). 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 (der Glimmrhythmus) findet vielleicht beim Abbau der Scintillons statt. Wie dieser erfolgt, ist noch nicht geklärt. Entweder schnüren sich dabei die Scintillons ab und werden in der Vakuole abgebaut, oder aber sie werden ins Zytoplasma entleert. Die zweite Möglichkeit scheint wahrscheinlicher zu sein. Die Scintillons werden am frühen Morgen abgebaut.

### 3.1 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 3.9). Die *Aktivität* der Luciferase und der Phosphorylierungsgrad bleiben dagegen konstant.

### 3 Rhythmen bei Lingulodinium

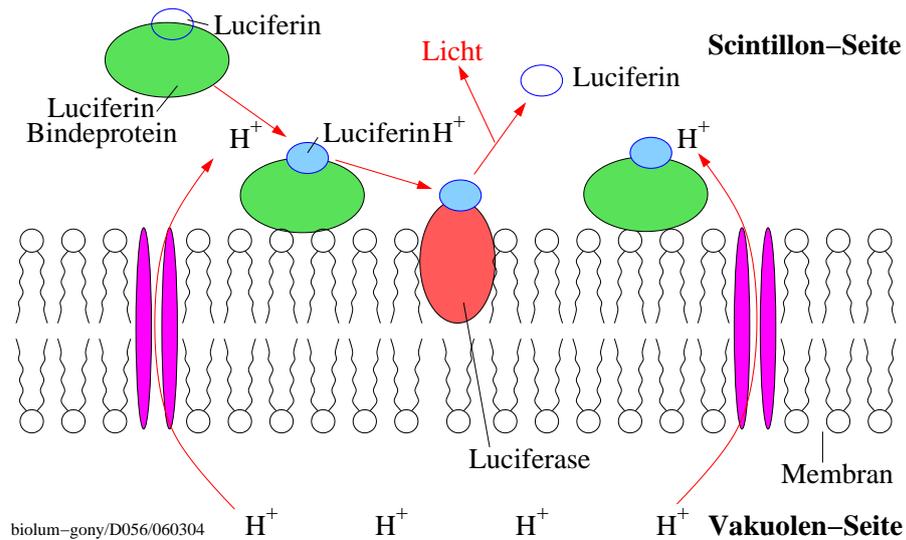


Abbildung 3.8: Mechanismus der Licht-Produktion bei *Lingulodinium polyedrum* im Scintillon. Ein kleines Stück der Scintillon-Membran ist wiedergegeben (Vakuole wäre unten, das Innere des Scintillons oben). Wenn  $H^+$ -Ionen durch Depolarisation (zum Beispiel als Folge vom Schütteln) in das Scintillon gelangen (gebogene rote Pfeile), 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. \(1981\)](#)

Die Proteinsynthese ist am Biolumineszenz-Rhythmus beteiligt, da Hemmstoffe der Proteinsynthese (Cycloheximid, Puromycin, Anisomycin) die Periode beeinflussen ([Taylor et al. \(1982\)](#)). Cycloheximidpulse verschieben den Rhythmus der 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 Pinealorgan, Tyrosinaminotransferase in der Leber,  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglytaryl-CoA Reduktase), Enzyme mit kurzer Halbwertszeit (0.5 bis 1 Stunde) beteiligt, die die Stoffwechselraten begrenzen. Andere Enzyme haben eine Halbwertszeit von mehreren Tagen. Die Proteinsynthese

spielt auch bei anderen Organismen für den circadianen Rhythmus eine Rolle, zum Beispiel bei *Aplysia* ([Jacklet \(1981\)](#)) und *Acetabularia* ([Schweiger \(1977\)](#)).

Einzelheiten der circadianen Kontrolle der Biolumineszenz sind noch unbekannt. Einige Beobachtungen sprechen für zwei Uhren: Zum Beispiel können Lichtpulse die Phase des Blitz- und die des 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

### 3.2 Bedeutung der Biolumineszenz

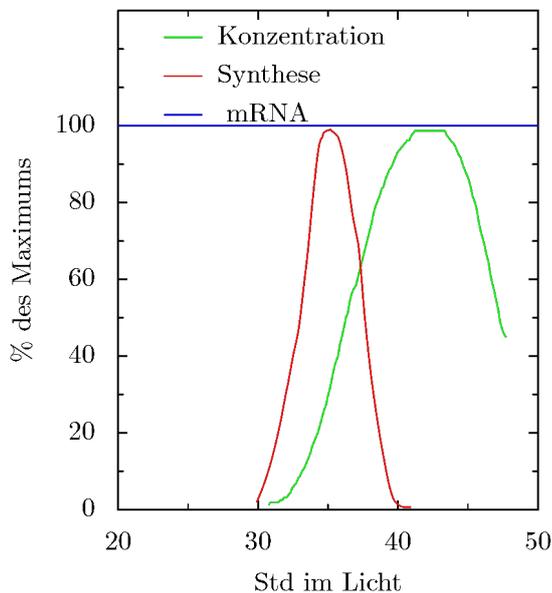


Abbildung 3.9: Das Luciferin-Binde-Protein von *Lingulodinium polyedrum* wird circadian rhythmisch synthetisiert (rote Kurve, Maximum der Synthese etwa 35 Stunden nach Beginn des Dauerlichtes nach einem vorausgegangenen 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel). Das LBP Protein erreicht nach 43 Stunden ein Maximum der Konzentration (grüne Kurve). Danach wird es abgebaut. Die für die LBP-Synthese verantwortliche mRNA ist dauernd vorhanden und aktiv (blaue Kurve). Die circadiane Steuerung der LBP-Synthese erfolgt also auf translationaler Ebene. Nach Morse et al. (1990)

geändert (Abbildung 3.10, Heyde et al. (1992)). Die optimale Lichtintensität ist für die beiden Biolumineszenzrhythmen unterschiedlich ( $6 \mu \text{ Einstein/cm}^2 \text{sec}$  für den Blitzrhythmus,  $90 \mu \text{ Einstein/cm}^2 \text{sec}$  für den Glimmrhythmus). Auch die Temperatur beeinflusst Blitz- und Glimmrhythmus unterschiedlich. Schließlich können auch der Biolumineszenzrhythmus und der Aggregationsrhythmus unterschiedliche Periodenlängen haben (Roenneberg and Morse (1993)). Es gibt also gute Hinweise darauf, dass zwei Uhren das circadiane System von *Lingulodinium* steuern (Heyde et al. (1992), Morse et al. (1994)).

### 3.2 Bedeutung der Biolumineszenz

Im Organismenreich kommt Biolumineszenz oft vor. 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 Japanischen Gewässern). Biolumineszenz kann auch als Schutz dienen. Feinde können abgeschreckt werden, die Tiere können sich tarnen oder Feinde vom Vorderende ablenken (Würmer).

Aber warum zeigt *Lingulodinium* 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. Andere Gründe wurden angeführt, warum sie Biolumineszenz besitzt. Durch die Biolumineszenz könnten Fische

### 3 Rhythmen bei *Lingulodinium*

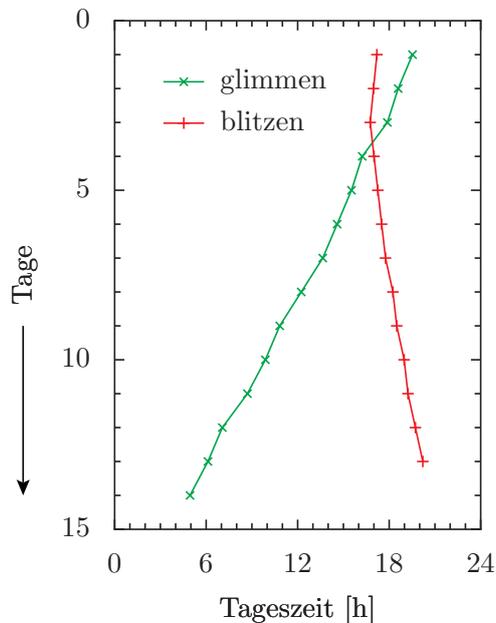


Abbildung 3.10: Unterschiedliche Periodenlängen des Blitz- und Glimmrhythmus von *Lingulodinium polyedrum* werden im Dauerlicht bei 21°C gefunden. Die täglichen Maxima des Glimmrhythmus (grüne x) und des Blitzrhythmus (rote Kreuze) wurden untereinander aufgetragen und mit einer Geraden verbunden. Die Periodenlänge des Glimmrhythmus beträgt 22,9, die des Blitzrhythmus 24,2 Stunden. Nach Heyde et al. (1992)

erschreckt werden, sodass sie die Algen nicht fressen.

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.

### 3.3 Rhythmen der Aggregation, Phototaxis, Vertikalwanderung und Mobilität

Bei *Lingulodinium*-Kulturen bilden die Zellen Schwärme. Sie können in Petrischalen beobachtet werden (Abbildung 3.11 und Roenneberg et al. (1989)). Dieses Verhalten stellt einen Populationsrhythmus dar, der drei Wochen endogen abläuft und dann desynchronisiert ist. Am Tage hält sich die Population an der Oberfläche auf, nachts sinkt sie zu Boden.

Der Aggregationsrhythmus ändert seine Periodenlänge mit der Lichtintensität. Allerdings hängt das von der Wellenlänge des Lichtes ab. Im Rotlicht steigt die Periode mit zunehmender Lichtintensität, im Blaulicht nimmt sie ab (Abbildung 3.12). Es wird vermutet, dass zwei verschiedene Photorezeptoren und möglicherweise auch zwei Uhren beteiligt sind (Roenneberg et al. (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

### 3.5 Circadiane Rhythmen in der Photosynthese

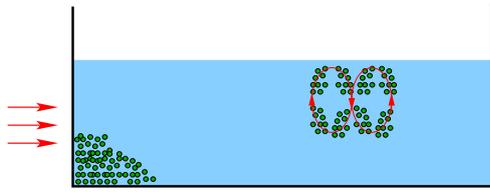


Abbildung 3.11: Schwarmbildung bei *Lingulodinium polyedrum* in einer Petrischale, die seitlich mit Licht von  $120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{sec}$  bestrahlt werden. Am Tage bilden sich an der Oberfläche des Seewassers Schwärme, bei denen in der Mitte der Ansammlung die Zellen nach unten sinken und am Rande nach oben aufsteigen. In der Nacht setzen sich die Zellen in der ursprünglich dem Licht zugewandten Seite ab. Nach [Roenneberg et al. \(1989\)](#)

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. \(1994\)](#)).

### 3.4 Chloroplastenrhythmen

Circadiane Unterschiede finden sich in den Chloroplasten von *Lingulodinium*. Die Ultrastruktur der Thylakoidanordnung ändert sich, wie in [Abbildung 3.13](#) gezeigt. 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. Auch 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 zwi-

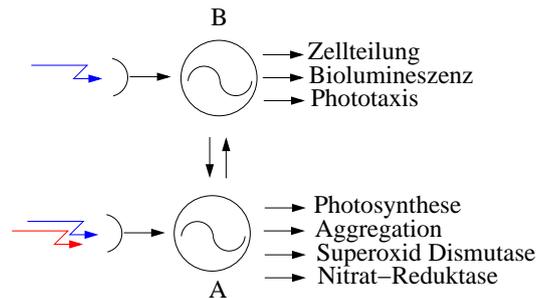


Abbildung 3.12: Das circadiane System von *Lingulodinium* soll aus einem A- und B-Oszillator bestehen. Der A-Oszillator (unten) kontrolliert unter anderem die Aggregation der Zellen, der B-Oszillator dagegen neben Zellteilung und Phototaxis die Biolumineszenz. Blaues Licht synchronisiert den B-Oszillator, Blau- und Rotlicht den A-Oszillator. Nach [Morse et al. \(1994\)](#)

schon 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 konstant ist, aber in Photosystem II schwankt. Demnach sind nur Änderungen im Photosystem II für den Photosyntheserhythmus von *Lingulodinium* verantwortlich ([Abbildung 3.14](#), siehe auch nächsten Abschnitt).

### 3.5 Circadiane Rhythmen in der Photosynthese

Strukturelle Änderungen im Photosyntheseapparat zeigten bereits, dass circadiane Rhythmen die Photosynthese beeinflussen. Eine Reihe von Vorgängen sind bei *Lingulodinium* beteiligt:  $\text{CO}_2$ -Aufnahme ([Hastings et al. \(1961\)](#)), Lichtreaktionen im Photosystem II ([Knoetzel](#)

### 3 Rhythmen bei *Lingulodinium*

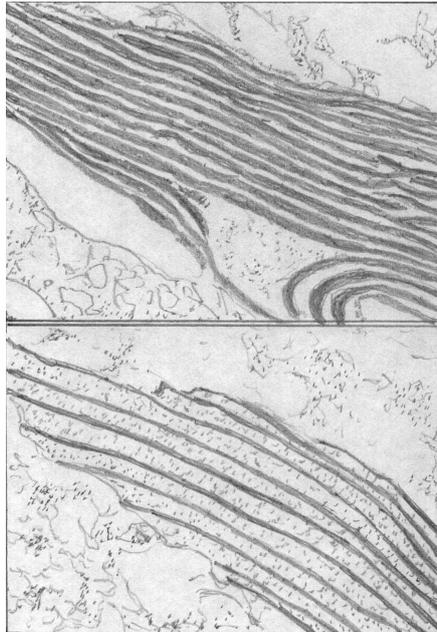


Abbildung 3.13: Die Thylakoide in den Chloroplasten von *Lingulodinium polyedrum* zeigen circadiane Unterschiede. In der subjektiven Nacht (CT 18) liegen sie enger zusammen (oberer Teil der Abbildung) als am subjektiven Tag (CT 6, unterer Teil der Abbildung). Gezeichnet vom Autor nach einer Abbildung in [Herman and Sweeney \(1975\)](#)

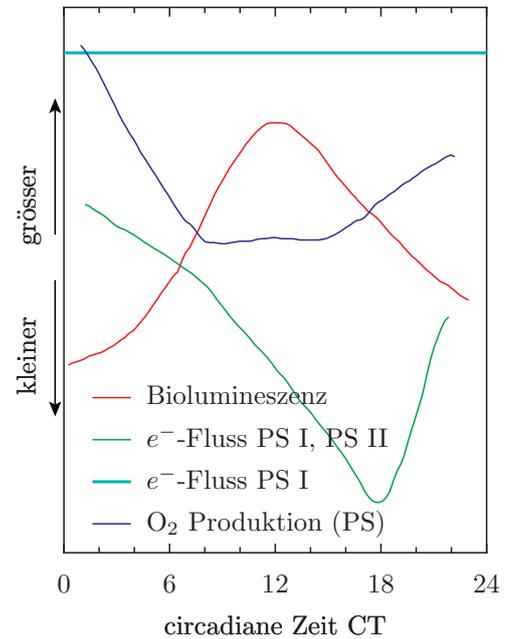


Abbildung 3.14: Grundlagen des Photosynthese-Rhythmus bei *Lingulodinium polyedrum*. Die Photosynthese (PS, blaue Kurve) schwankt circadian (Sauerstoffproduktion gemessen). Sie hat niedrige Werte in der Nachtphase, wenn die Biolumineszenz hoch ist (rote Kurve). Mit dem Elektronenakzeptor Methylviologen wurde gezeigt, dass der Elektronenfluss im Photosystem I konstant ist (PS I, blaugrüne Gerade), aber in Photosystem I und II circadian schwankt (PS I, PS II, hellgrüne Kurve). Demnach sind nur Änderungen im Photosystem II für den Photosynthese-Rhythmus von *Lingulodinium* verantwortlich. Die x-Achse gibt circadiane Zeit CT wieder. Die Messgrößen sind nicht auf der y-Achse angegeben. Siehe dazu [Samuelsson et al. \(1983\)](#)

and Rensing (1990)), Chlorophyllfluoreszenz und -Abbau (Sweeney (1981)) sind Beispiele. Die Photosynthese selbst ist aber nicht ein Bestandteil der Uhr: Blockiert man den Elektronenfluss im Photosystem II mit DCMU, läuft die Uhr trotzdem weiter (Sweeney et al. (1979)).

CO<sub>2</sub>-fixierende Enzyme zeigen keinen Rhythmus. Auch die O<sub>2</sub> Aufnahme ist konstant. Die Atmung ist daher nicht für den circadianen Rhythmus verantwortlich. In der Mitte der subjektiven Lichtperiode ist die O<sub>2</sub>-Abgabe hoch, in der Mitte der subjektiven Dunkelperiode niedrig (Abbildung 3.15).

Da sich die Dichte einer Zelle mit der Photosynthese ändert, konnte mit Hilfe eines Cartesischen Tauchers ein circadianer Rhythmus in einer einzelnen *Lingulodinium*-Zelle nachgewiesen werden (Abbildung 3.16, Sweeney (1960)). Auch hier verschwindet der Rhythmus bei hoher Lichtintensität. Die Dämpfung beruht also nicht auf einer Desynchronisation der Rhythmen zwischen den Einzelzellen einer Population.

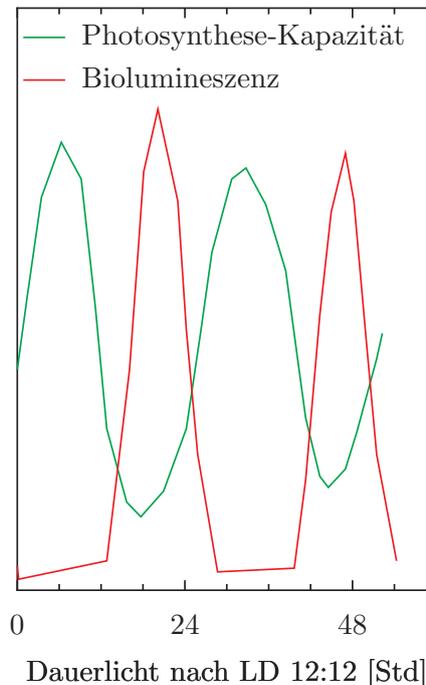


Abbildung 3.15: Photosynthetische Kapazität bei *Lingulodinium polyedrum* (grüne Kurve): Proben wurden zu verschiedenen Phasen für 15 Minuten während Starklicht mit C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> begast. Es wurde bestimmt, wie viel C<sup>14</sup> aufgenommen wurde. Zusätzlich wurde der Verlauf der Biolumineszenz dargestellt (rote Kurve). Nach Hastings et al. (1961)

### 3.6 Zellteilungsrythmus

Die Zellteilung erfolgt in einer Population von *Lingulodinium* 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 3.17, Sweeney (1984)).

Der Zellteilungszyklus einer Zelle stellt also keinen eigenen circadianen Rhythmus dar, sondern wird nur von der circadianen Uhr gesteuert (Sweeney and Hastings (1958)), indem durch 'gating' die Tei-

### 3 Rhythmen bei *Lingulodinium*

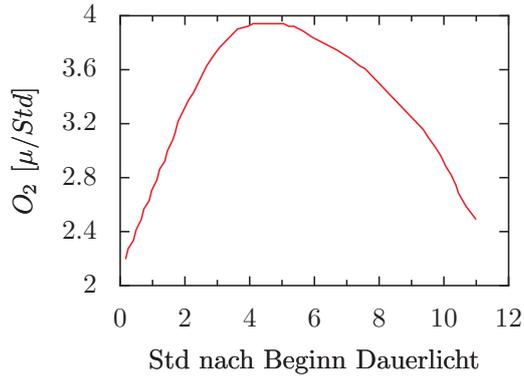


Abbildung 3.16: Der Verlauf der Photosynthese einer einzelnen *Lingulodinium*-Zelle wurde während der Lichtperiode mit einem Cartesischen Taucher bestimmt. Die Dichte der Zelle hängt von der Sauerstoffproduktion ab. Damit ändert sich die Position des Cartesischen Tauchers (in dem sich die Zelle befindet) im Gefäß. Nach [Sweeney \(1960\)](#)

lungen nur in bestimmten Zeitfenstern erfolgen können ([Vicker et al. \(1988\)](#)). Mitosen finden sich im allgemeinen gegen Ende der Dunkelperiode oder etwas früher. Die Cytokinese dauert bei *Lingulodinium* eine Stunde. Der Zellteilungsrythmus ist nicht mit dem Biolumineszenzrythmus ursprünglich 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 ultradia-

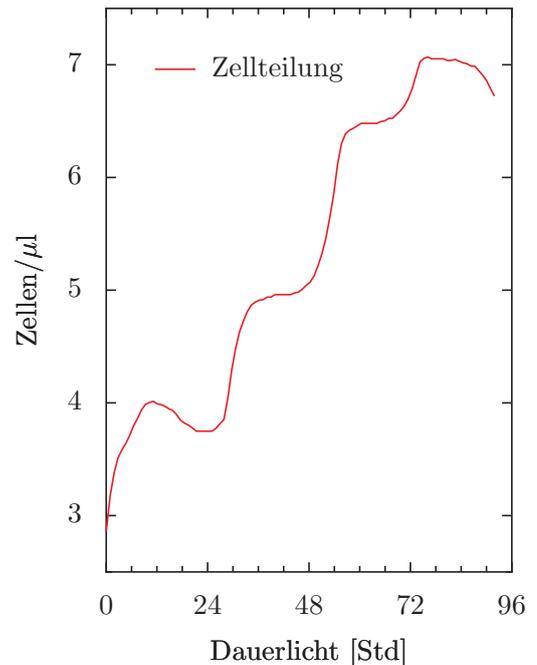


Abbildung 3.17: Circadianer Rhythmus der Zellteilung von *Lingulodinium polyedrum*: Die Zahl der Zellen pro  $\mu\text{l}$  nimmt trotz Dauerlicht (von 3000 Lux) nicht kontinuierlich, sondern stufenförmig zu. Auf der x-Achse ist die circadiane Zeit CT aufgetragen. Periodenlänge ist etwa 24 Stunden. Nach [Vicker et al. \(1988\)](#)

ne 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) Lloyd and Gilbert (1998)). Verschiedene Modelle wurden vorgeschlagen, um den Zellzyklus und seine zeitliche Steuerung zu simulieren (Tyson (1987), Übersicht Lloyd and Gilbert (1998)).

## 3.7 Circadiane Rhythmen im Stoffwechsel und von Enzymen

Der Trikarbonsäurezyklus wird bei *Lingulodinium* rhythmisch gesteuert. Wahrscheinlich wird dabei auf der Proteinebene eine NAD- oder NADH-abhängige Form der Isocitrat-Dehydrogenase rhythmisch kontrolliert; diese wiederum steuert den Stoffwechselfluss durch den TCA-Zyklus rhythmisch (Abbildung 3.18, Aki-moto et al. (2005)).

Circadiane Rhythmen wurden bei einer Reihe von Enzymen gefunden. Die Nitrat-Reduktase gehört dazu (Abbildung 3.19 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 3.19 und Colepicolo et al. (1992)). Ob ihre Konzentration circadian schwankt, ist nicht bekannt. Dieses Enzym ist ein Superoxid-Anionen-Fänger ('scavenger'). Im Fall der RUBISCO, dem häufigsten Enzym der Biosphäre, weil es CO<sub>2</sub> während der Photosynthe-

se 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 ist auch der Fall beim Enzym Luciferase, das 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)).

## 3.8 Wirkung von Substanzen auf den circadianen Rhythmus, Membranen

Verschiedene Substanzen beeinflussen den circadianen Rhythmus von *Lingulodinium*. 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 Abbildung 4.5). Membranaktive Substanzen wie K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, D<sub>2</sub>O, Valinomycin (Sweeney (1974)), 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

### 3 Rhythmen bei *Lingulodinium*

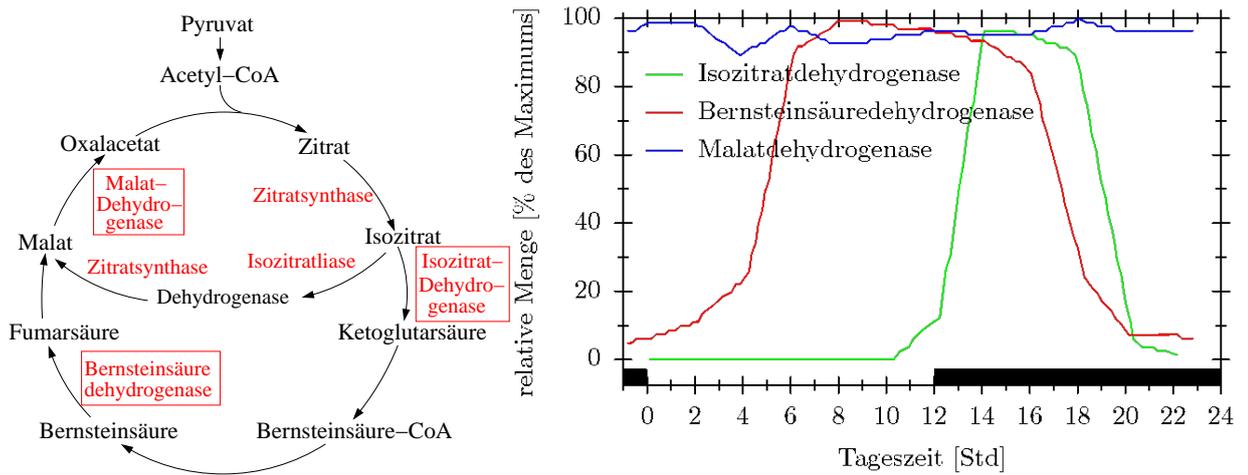


Abbildung 3.18: Links der Trikarbonsäurezyklus mit Enzymen (rot) für Zwischenschritte. Rot umrandet die im rechten Diagramm dargestellten Enzyme. Rechts circadianer Rhythmus der Isozitatdehydrogenase (grün) und der Bernsteinsäuredehydrogenase (rot). Die Malatdehydrogenase (blau) zeigt keine größeren Schwankungen. Nach [Akimoto et al. \(2005\)](#)

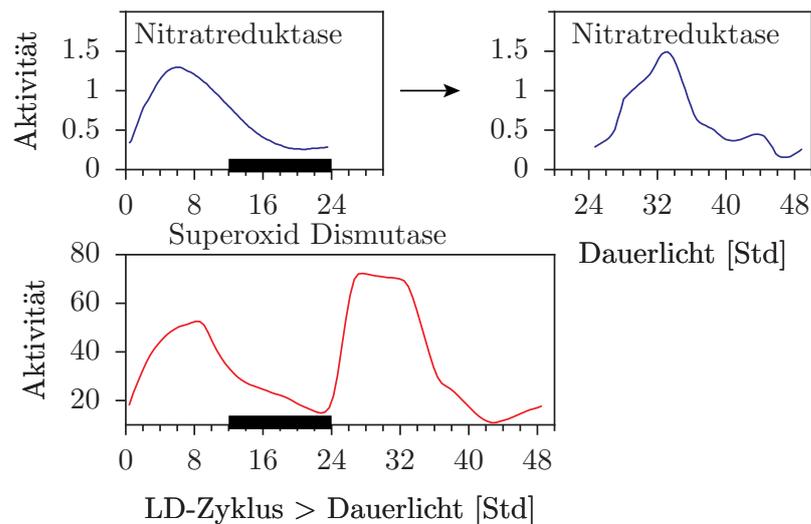


Abbildung 3.19: Circadianer Rhythmus der Nitrat-Reduktase (oben) und der Superoxiddismutase bei *Lingulodinium polyedrum*. Oben links: Im Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 Stunden Weißlicht von  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{sec}$ , rechts im Dauerlicht (Stunden nach Beginn des Dauerlichtes  $35 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{sec}$ ). 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. \(1992\)](#)

### 3.8 Wirkung von Substanzen auf den circadianen Rhythmus, Membranen

könnte es sich auch um Stoffwechselunterschiede handeln oder die Proteinsynthese könnte beeinflusst sein. Als Test wurden Membraneigenschaften geändert und mit Fluoreszenz-Polarisationstechniken gemessen. Dabei ergaben sich keine Korrelationen zwischen Membranen und der Periodenlänge (Scholübbbers 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 (1981)), 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 Energieverbrauchenden Stellen, verkürzt die Periode von 23 auf 18 Stunden (Roenneberg et al. (1988), Roenneberg and Taylor (1994)). Es verstärkt den Phasenverschiebenden Effekt von Blaulicht und die Phototaxis. Creatin scheint jedoch in *Lingulodinium* nicht natürlich vorzukommen. Stattdessen gibt es eine andere Substanz, Gonyaulin, welches die Periode verkürzt (Roenneberg et al. (1988), Roenneberg et al. (1991)).

### 3 *Rhythmen bei Lingulodinium*

## 4 Rhythmen bei *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. Pflanzungen 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 haben sie einen Hut ("umbrella" italienisch, "mermaids wineglass" in den USA, Abbildung 4.1). Die meisten *Acetabularien* kommen in flachen Bereichen der Küsten tropischer und subtropischer Meere vor.

Abbildung 4.1: Verschiedene Stadien der einzelligen Schirmalge *Acetabularia mediterranea*. Die kürzeste ist eine keimende Zygote (aus der Verschmelzung zweier Gameten entstanden), die mit einem Rhizoid am Boden befestigt ist. Sie streckt sich zu einem Stiel und bildet Wirtel aus, die später wieder verloren gehen. Schließlich wird ein Hut gebildet, der in zahlreichen Kammern viele Zysten bildet. In ihnen entstehen die Gameten. Die Alge wird etwa 50 mm lang. Sie kommt im Mittelmeer und dem westlichen Atlantik vor. Nach Gibor (1966)

## 4.1 Tagesrhythmische Phänomene

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 and Schweiger (1977), Broda and Schweiger (1981), Koop et al. (1978)). Die Chloroplasten wandern in der Nacht zum Rhizoid am Fuß der Alge und am Tage zu den oberen Teilen der Alge. Die Gestalt der Chloroplasten ändert sich ebenfalls tagesperiodisch (rund in der Dunkelperiode, oval in der Lichtperiode (vanden Driessche et al. (1976)) und circadian (vanden Driessche (1966), vanden Driessche (1967)). 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)).

## 4.2 Rolle des Kerns

Die Zelle kann während der vegetativen Phase leicht entkernt werden (Schweiger (1977)). Da sich der Kern zu dieser Zeit im Rhizoid befindet, braucht man dieses nur abzuschneiden. Die  $O_2$ -Produktion bei der Photosynthese ist auch ohne Zellkern unter konstanten Bedingungen rhythmisch (Abbildung 4.2). Also befindet sich der Oszillator im Zytoplasma. Die Integrität der Zelle ist für den circadianen Rhythmus nicht nötig. Auch kleinere Zellfragmente zeigen noch einen circadianen Rhythmus.

Es zeigte sich, dass die mRNA von *Acetabularia* besonders dann, wenn der Kern fehlt, für Wochen stabil ist.

Da der Kern im Fuß der Alge sitzt, konnte man Pflöpfexperimente machen, um die Bedeutung des Kerns für die Tagesrhythmik zu untersuchen (Schweiger (1977), Sweeney and Haxo (1961), Schweiger et al. (1964), Karakashian and Schweiger (1976), Terborgh and McLeod (1967)). Der Kern einer anderen Zelle kann gewaschen und in ein kernfreies Zellfragment implantiert werden (Hämmerling (1963)). Pflöpft man Rhizoide von *Acetabularien* auf Stiele von Algen mit phasenverschobenem Rhythmus der  $O_2$ -Produktion, wird deren Rhythmus im Dauerlicht vom Kern-haltigen Rhizoid bestimmt (Abbildung 4.3, Schweiger et al. (1964)). Um cytoplasmatische Effekte (wie beispielsweise über 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 (1967) pflöpfte 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. Da auch kernlose *Acetabularien* circadian Photosynthese betreiben, ist offenbar keine kontinuierliche Transkription des Kerngenoms für die Schwingungen nötig. Dafür spricht auch, dass ein Hemmstoff der Transkription im

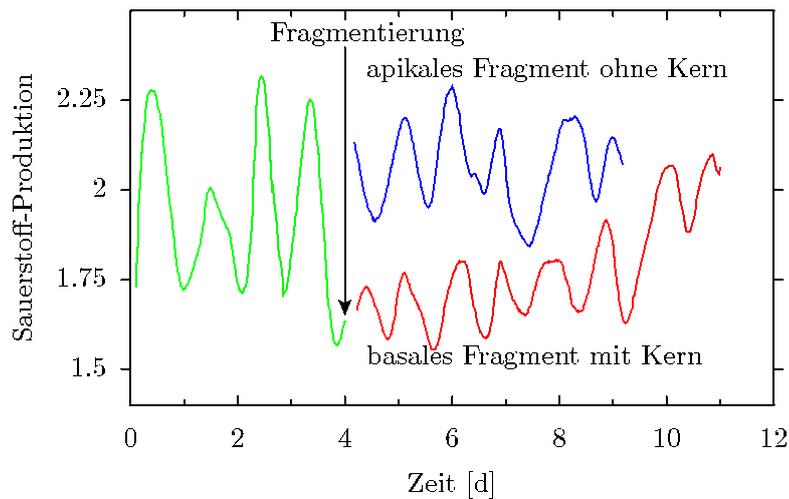


Abbildung 4.2: O<sub>2</sub> Rhythmus vor (grüne Kurve, bis senkrechten Pfeil) und nach Fragmentierung einer *Acetabularia mediterranea* Zelle in einen kernlosen apikalen (blaue Kurve) und einen kernhaltigen basalen Teil (rote Kurve). Nach Schweiger (1984)

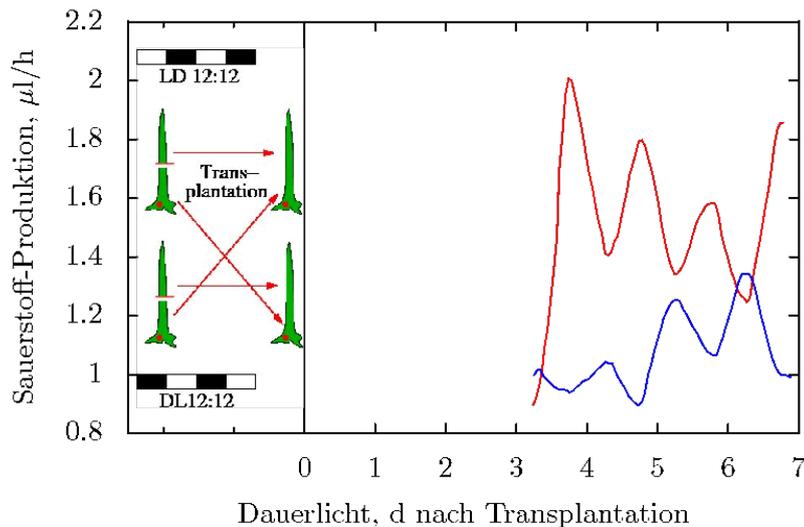


Abbildung 4.3: Zwei *Acetabularia* Algen wurden in inversen Licht-Dunkel-Zyklen gehalten (siehe LD 12:12 und die schwarzen und weißen Balken vor der Transplantation über und unter den *Acetabularien*). Das Rhizoid mit dem (in der Abbildung rot markierten) Kern der Alge links oben wurde mit dem Stiel der Alge links unten gepfropft, auf das Rhizoid der unteren linken Alge wurde der Stiel der oberen linken Alge gepfropft. Die nach drei Tagen begonnenen Messungen zeigen gegenläufige Rhythmen. Vergleiche mit Kontrollen (nicht dargestellt) zeigen, dass der Kern die Phasenlage des Pflanzproduktes bestimmt. Nach Schweiger et al. (1964)

#### 4 Rhythmen bei Acetabularia

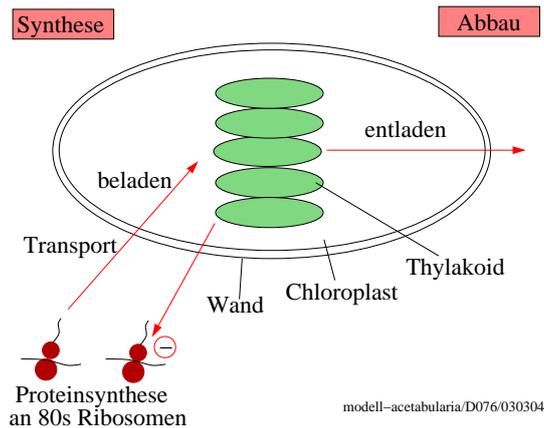


Abbildung 4.4: *Translations-Membran-Modell des circadianen Mechanismus von Acetabularia von Schweiger und Schweiger. Essentielle Proteine werden durch 80s Ribosomen hergestellt und über das Cytosol in die Chloroplasten transportiert. Dort werden sie in die Thylakoid-Membranen eingebaut. Nach dem Beladen wird die Proteinsynthese gehemmt, die essentiellen Proteine abgebaut, bis die Thylakoide entladen sind (Abbau, rechter Teil der Abbildung). Jetzt kann der Zusammenbau (Synthese, linker Teil der Abbildung) wieder beginnen. Nach Engelmann and Schrempf (1979)*

Kern, Actinomycin, den Rhythmus der Algen nicht unterbindet (Mergenhagen and Schweiger (1975)). Hemmstoffe der Transkription in Organellen wie Rifampicin haben ebenfalls keinen Einfluss auf den circadianen Rhythmus (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 (1975), Karakashian and Schweiger (1976)).

Aus diesen Beobachtungen leitete Schweiger ein Translations-Membran Modell ab (Abbildung 4.4). Zentrale Kom-

ponenten 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 Eigenschaften 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 4.5): 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). Beides zusammen ergibt demnach eine nur geringe Abhängigkeit der Periodenlänge von der Temperatur.

Woolum (1991) überprüfte die Ergebnisse an kernhaltigen und kernlosen *Aceta-*

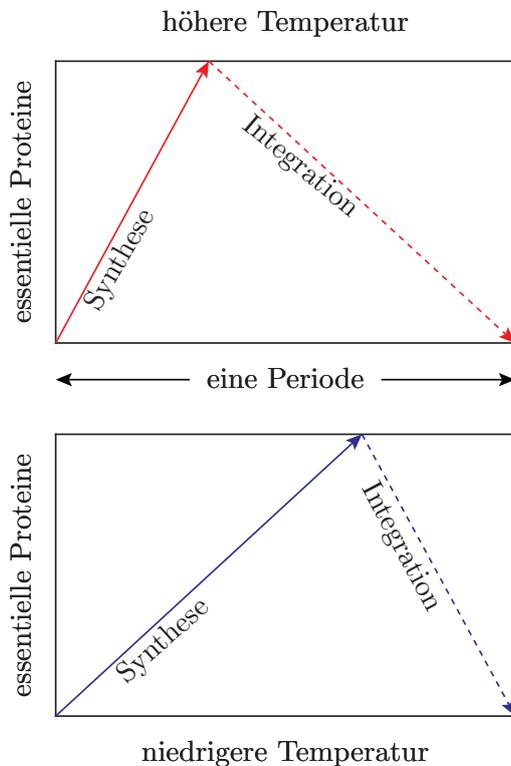


Abbildung 4.5: Temperaturkompensation des circadianen Rhythmus von *Acetabularia*. Bei hoher Temperatur verläuft die Synthese der essentiellen Proteine rascher, die Integration in die Thylakoide aber langsamer. Bei niedriger Temperatur ist die Synthese verlangsamt, die Integration aber beschleunigt. Auf diese Weise ist die Länge der Periode nur wenig von der Temperatur abhängig. Die Geschwindigkeit wird durch die Steigung der Geraden wiedergegeben. Nach [Engelmann and Schrempf \(1979\)](#)

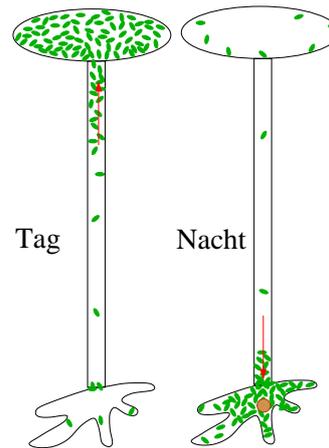


Abbildung 4.6: Circadiane Chloroplastenwanderung in einer *Acetabularia mediterranea* Zelle. Am Tage im Hut und oberen Stiel angereichert (links), nachts im Rhizoid und unteren Teil des Stiels. Nach [Schweiger \(1984\)](#)

*Acetabularien*. Er benutzte statt der  $O_2$ -Abgabe die circadiane Chloroplastenbewegung im Rhizoid mit Lichtschranken, wie von [Schmid and Koop \(1983\)](#) beschrieben (Abbildung 4.6). 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 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)).

### 4.3 Mehrere Oszillatoren?

Sind die verschiedenen circadianen Schwingungen bei *Acetabularia* 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 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.

### 4.4 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. Sie behielt ihren vorher eingestellten Rhythmus unverändert bei (7 Tage gemessen). Auch *Euglena* und *Lingulodinium* beeinflussen sich in ihrer Phasenlage nicht gegenseitig.

## 5 Rhythmen bei *Chlamydomonas*



Abbildung 5.1: *Chlamydomonas reinhardtii* ist eine begeißelte Grünalge und gehört zu den Chlorophyten. Bilder von Jens Bösgen, freundlicherweise von Maria Mittag vom Institut für Allgemeine Botanik, Friedrich Schiller Universität Jena zur Verfügung gestellt. Links mit gelbem Augenfleck, im rechten Bild ist der U-förmige Chloroplast gut sichtbar.

*Chlamydomonas* ist eine Bodenalge, die auch schwimmen kann (Abbildung 5.1). Sie kann Photosynthese betreiben (Matsuo et al. (2005)), hat aber auch viele Eigenschaften von Tieren (und die entsprechenden Gene). Sie wird als 'Grüne Hefe' bezeichnet, ähnelt aber eher Pflanzen und Tieren (Brunner and Merrow (2008)). Mit einem Augenfleck kann sie Licht auffangen und auf einen Membran-gebundenen Photorezeptor reflektieren (siehe Kateriya et al. (2004), Nagel et al. (2005), Oldenhof et al. (2006)), der Rhodopsin enthält (Grossman et al. (2007)). *Chlamydomonas* hat mehr als 15 000 Gene, von denen viele Transporter kodieren (Matsuo et al. (2008)).

Wie Tiere, Pflanzen, Pilze und Cyanobakterien besitzt *Chlamydomonas* eine circadiane Uhr, die aber wahrscheinlich bei allen aufgeführten Gruppen unabhängig voneinander entstanden ist. Die circadiane Uhr wurde von Bruce (1970) an der Phototaxis von *Chlamydomonas* untersucht (Lichtbewegungen bei Mikroorganismen sind in Sgarbossa et al. (2002) beschrieben). Er fand auch verschiedene Uhr-Mutanten. Die Zellen zeigen ferner eine rhythmische UV-Empfindlichkeit (Nikaido and Johnson (2000), Abbildung 5.2). Auch die Wachstumsrate schwankt circadian.

### 5.1 Uhrmechanismus

Die circadiane Uhr von *Chlamydomonas* benutzt Phosphatasen und Kinasen und beruht auf Stoffwechselfvorgängen wie Phosphorylierungen (siehe auch Kapitel 2). Phosphorylierungen (Merrow et al. (2006)) interagieren mit artspezifischen Transkriptions-Rückkopplungskreisen (Mittag and Wagner (2003), Mittag et al. (2005)). Matsuo et al. (2006) brachte Luciferase in das *Chlamydomonas*-Genom, sodass ein Leuchtrhythmus gemessen werden konnte. Durch Vorwärts-Gen-Screening<sup>1</sup> konnten 105 Klone identifiziert werden (Matsuo et al. (2008)). 32 davon

<sup>1</sup>Ein genetischer Screen liest Individuen mit einem bestimmten Phänotyp aus. Sucht man dabei neue Gene, spricht man von 'forward genetics', während bei 'reverse genetics' Mutanten bereits bekannter Gene gesucht werden

## 5 Rhythmen bei Chlamydomonas

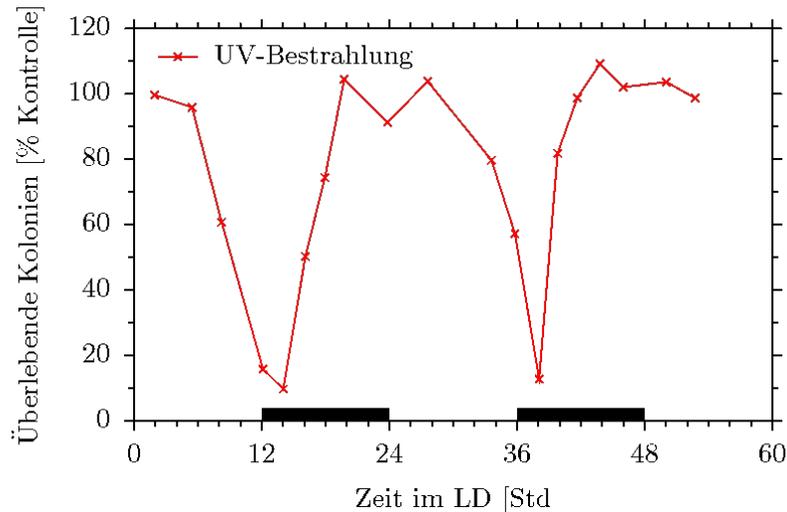


Abbildung 5.2: *Chlamydomonas reinhardtii* Kolonien sind rhythmisch gegenüber UV empfindlich, wenn sie zu verschiedenen Tageszeiten bestrahlt werden. Nach Suzuki and Johnson (2002)

zeigten unterschiedliche Periodenlängen, Phasenlagen und Amplituden des Rhythmus. 78% waren arrhythmisch oder hatten eine sehr niedrige Amplitude. Der Wachstumsrhythmus wurde entsprechend beeinflusst.

CHLAMY1 ist ein RNA-Bindeprotein, das als post-Transkriptions-Regulator z.B. Protein-Turnover und Ubiquitin-Proteasome steuert. Dabei spielen Phosphatasen eine Rolle (Brunner and Diernfellner (2006)). Der Uhr-Mechanismus ähnelt z.T. dem von *Arabidopsis thaliana*, die beteiligten Domänen sind aber keine echten Homologe (Schmidt et al. (2006), Wagner et al. (2005), Wagner et al. (2006)).

### 5.2 Photoperiodismus bei *Chlamydomonas*

*Chlamydomonas* wächst im Langtag schneller als im Kurztag. Es handelt sich um eine photoperiodische Reaktion auf Umwelt-

bedingungen (Suzuki and Johnson (2002)).

Unter nicht-optimalen Bedingungen (niedriges Stickstoffangebot) bilden die haploiden vegetativen Zellen Gameten, die sich paaren und eine diploide Zygospore bilden. Sie ist dormant und teilt sich nicht. In diesem Zustand werden ungünstige Bedingungen wie Dunkelheit, Trockenheit und Nahrungsmangel besser überstanden. Die Keimung dieser Sporen ist in verschiedenen Tageslängen unterschiedlich (Abbildung 5.3). Es wird aber nicht die Keimung selbst photoperiodisch gesteuert, sondern ein früheres Ereignis. Die Zygosporen keimen synchron, wenn sie für einen Tag in Dauerlicht gebracht werden, dann sechs Tage in Dauerdunkel, dann wieder in Dauerlicht (Harris (1998)). 12 bis 16 Stunden später keimen sie. Dann findet Meiose statt und Teilungen zu haploiden vegetativen Zellen.

## 5.2 Photoperiodismus bei Chlamydomonas

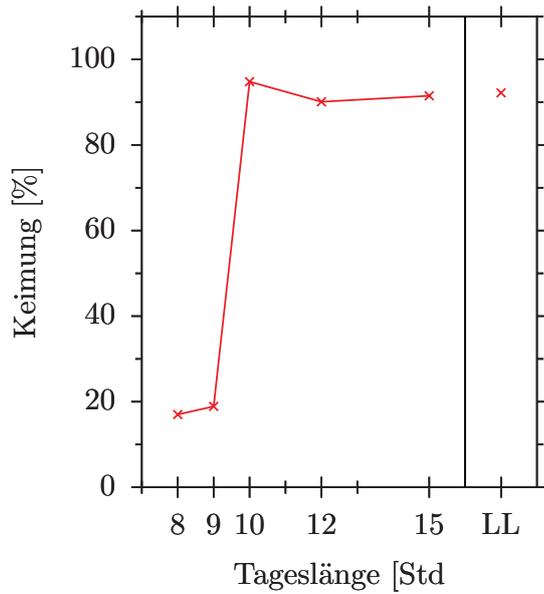


Abbildung 5.3: *Chlamydomonas reinhardtii* Zygosporen wurden in verschiedenen Tageslängen (8:16, 9:15, 10:10, 12:12, 15:9 Stunden L:D und Dauerlicht LL) gehalten. Der Prozentsatz der Keimung 10 Tage nach der Paarung ist dargestellt. Nach [Suzuki and Johnson \(2002\)](#)

## 5 *Rhythmen bei Chlamydomonas*

## 6 Rhythmen bei Amöben, Hefen und Pilzen

Hier könnten eine ganze Reihe von Einzellern mit circadianen Rhythmen vorgestellt werden, die keine Photosynthese besitzen. Ich beschränke mich aber auf drei Beispiele. Im ersten wird ein Rhizopode beschrieben, dessen rhythmischer Wechsel zwischen einer Ruheform und einer beweglichen Phase ungewöhnlich ist. Die Hefe als zweites Beispiel oszilliert in einem ultradianen Rhythmus, der aber Temperatur-kompensiert ist. Der Schimmelpilz *Neurospora* hat einen circadianen Rhythmus.

### 6.1 *Thalassomyxa*

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 (6.1). 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)). Die Periodenlänge

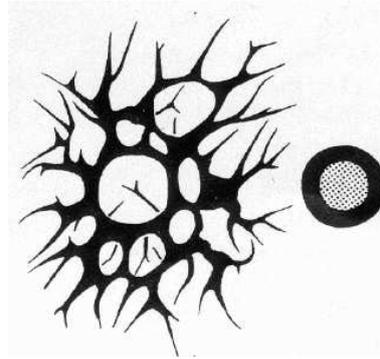


Abbildung 6.1: *Thalassomyxa australis* ändert seine Form rhythmisch zwischen einer aktiven Phase mit Pseudopodien (links) und Ruhephase (rechts). Nach Grell (1985)

dieses rhythmischen Formwechsels hängt von der Temperatur ab (Abbildung 6.2). Temperaturkompensation wird aber als eine charakteristische Eigenschaft circadianer Rhythmen angesehen. Auch die Synchronisation durch einen Licht-Dunkel-Wechsel und durch einen Temperatur-Wechsel funktioniert nicht in der üblichen Art (Abbildung 6.3, Smietanko et al. (1988)). Schütteln der Kultur (wie es im Meer durch die Gezeiten erfolgt) synchronisiert nur teilweise; dieser Zeitgeber ist also schwach. Kombinierte Zeitgeber (Temperaturwechsel, Licht-Dunkel-Wechsel, periodisches Schütteln als Simulation der Ebbe/Flut Bedingungen) synchronisieren (Abbildung 6.4). Es ist unbekannt, welche Zeitgeber in der Natur wirken. Möglicherweise handelt es sich also

## 6 Rhythmen bei Amöben, Hefen und Pilzen

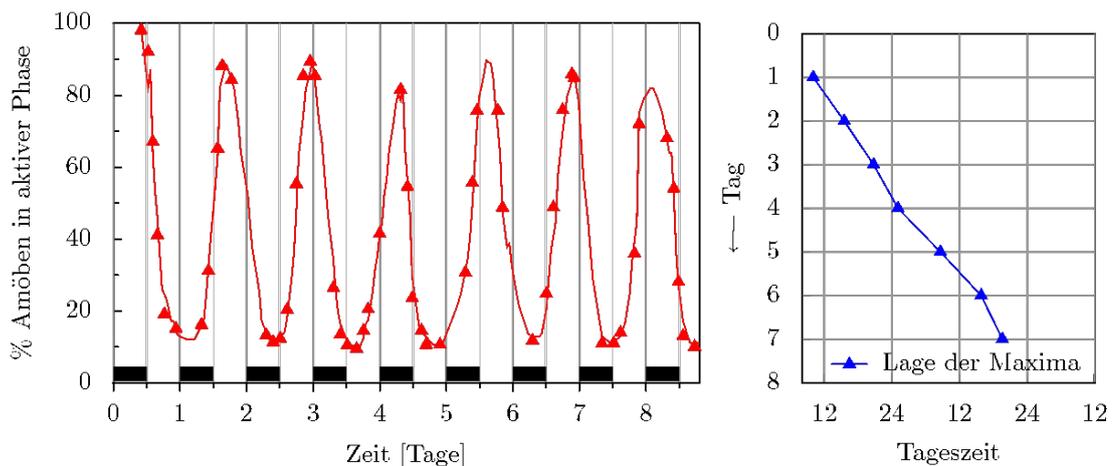


Abbildung 6.3: Rote Kurve im linken Teil der Abbildung zeigt den Prozentsatz von *Thalassomyxa* Amöben in der aktiven Phase, mit Maxima als Dreiecke (x-Achse: Tage). Der Formwechsel von *Thalassomyxa australis* lässt sich nicht durch einen 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel synchronisieren (siehe die Lage der Maxima (Dreiecke) zu den hellen/dunklen Balken). Das wird auch im rechten Teil gezeigt, wo die Maxima (blaue Dreiecke) jeden Tag um 5 Stunden später erscheinen. Wäre der Rhythmus synchronisiert, müssten sie genau untereinander liegen

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)).

### 6.2 Hefe, 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 6.5). Duysens and Ames (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-

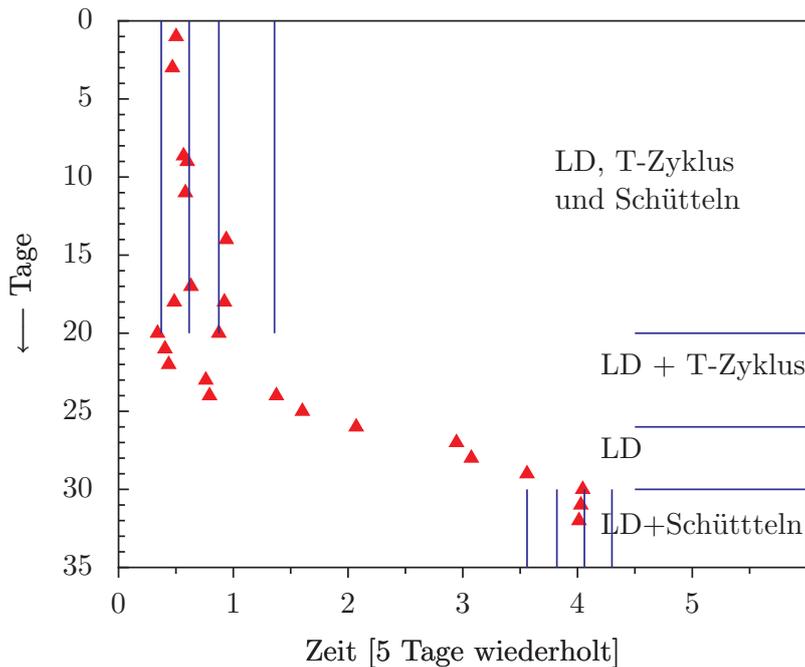


Abbildung 6.4: Kombinierte Zeitgeber (Licht-Dunkel-Wechsel, Temperatur-Wechsel und Schüttelperioden im 6-Stunden-Takt, oberer Teil der Abbildung) synchronisieren den rhythmischen Formwechsel von *Thalassomyxa australis*, während weder die Kombination eines Licht-Dunkel-Zyklus und eines Temperaturzyklus (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)

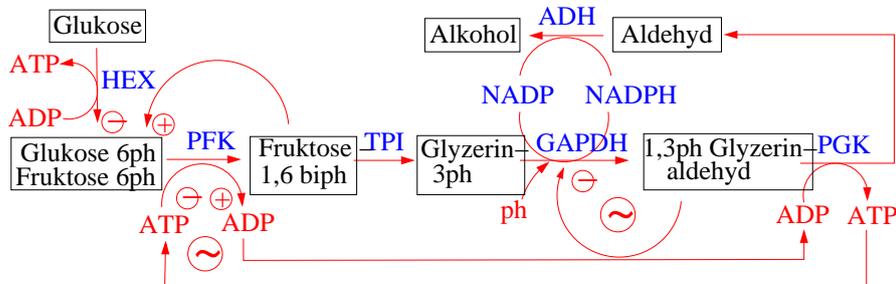


Abbildung 6.5: Verlauf der Glykolyse bei Hefe und Rückkopplungen von Substraten auf die Enzyme. Mit ~ sind die Stellen markiert, an denen Schwingungen entstehen. →: Fluss. Gebogene Pfeile: Rückkopplungspfade. +: Aktivierung, -: Hemmung. Beteiligte Enzyme: HEX: Hexokinase, PFK: Phosphofruktokinase, TPI: Triosephosphat-Isomerase, GAPDH: Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, ph: Phosphat, PGK: Phosphoglyzerokinase, ADH: Aldehyd-Dehydrogenase, NADP: Nicotinamid-Dinukleotid-Phosphat. ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, Nach Chance et al. (1967)

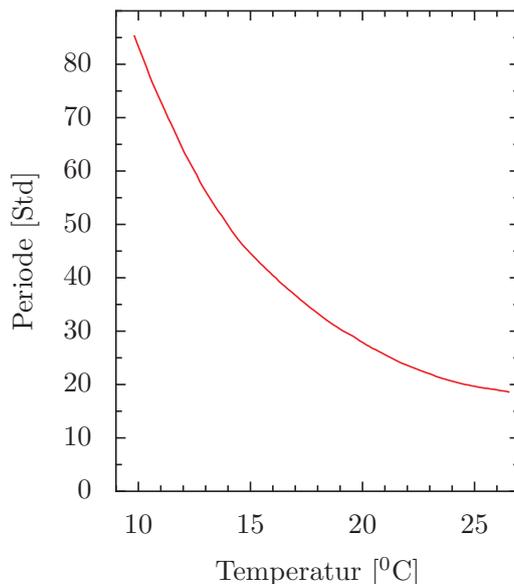


Abbildung 6.2: Der Wechsel zwischen aktiver Phase und Ruhephase von *Thalassomyxa australis* hängt von der Temperatur des Seewassers ab. Auf der y-Achse ist die Periodenlänge, auf der x-Achse die Temperatur des Seewassers aufgetragen, in der die Amöben gehalten wurden. Nach [Silyn-Roberts et al. \(1986\)](#)

sen werden (Abbildung 6.6). Je nach den Bedingungen beträgt die Periodenlänge zwischen zwei und 70 Minuten. Sie ist stark von der Temperatur abhängig.

Um das Phänomen zu beobachten, 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 Kaliumcyanid KCN zugegeben. Den Zellen steht jetzt kein Sauerstoff mehr zur Verfügung. Die nun ablaufende Glykolyse verläuft bei 20°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 6.5). 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. Die Glykolyse-Oszillationen sind auch in zellfreien Extrakten zu beobachten ([Hess and Boiteux \(1971\)](#)).

Für die zeitliche Kontrolle und Koordination von Stoffwechselfvorgängen 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 *Paramecium*. Wenn man die Bewegung einzelner Pantoffeltierchen unter dem Mikroskop beobachtet, findet man Zeitabschnitte, in denen diese Einzeller

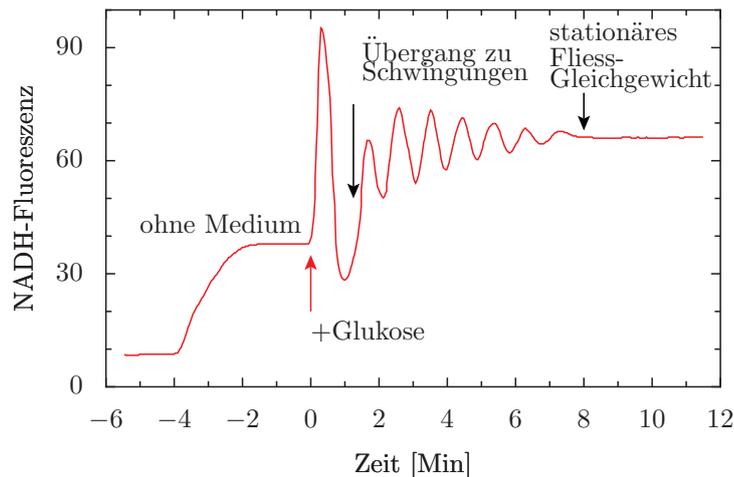


Abbildung 6.6: Induktion der Glykolyse-Oszillation bei einer Hefesuspension. Zum Zeitpunkt 0 (blauer Pfeil) wurde die ('ausgehungerte') Suspension mit Glukose versetzt. Das stationäre Fließgleichgewicht wird nach einem oszillatorischen Übergang erreicht. Die Glykolyse wurde durch die Fluoreszenz der NADH (y-Achse) gemessen. Nach Antkowiak (1987)

längere Stücke mehr oder weniger geradeaus schwimmen und nur selten eine andere Richtung einschlagen. Nach einer gewissen Zeit ändert sich das Schwimmuster. Jetzt werden nur kurze Stücke geradeaus zurückgelegt und häufig die Richtung gewechselt. Dieser Verhaltenswechsel zeigt Perioden von 45 Minuten (Lloyd and Kippert (1987)). 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. Inzwischen wurden weitere Beispiele für Temperatur-kompensierte ultradiane Rhythmen gefunden (Übersicht Lloyd and Rossi (1992)).

Zum Beispiel kontrolliert in rasch wachsenden Zellen von *Schizosaccharomyces pombe* eine ultradiane Uhr die Zellteilung. Es zeigt sich ein Rhythmus mit einer Periodenlänge von 40 bis 44 Minuten (Abbildung 6.7). Dieser Rhythmus

ist Temperatur-kompensiert und unabhängig von der Wachstumsrate (Kippert and Lloyd (1995)). Er hält mindestens 18 Stunden ohne Dämpfung an. Das spricht für interzelluläre Kommunikation. Mit der gleichen Periode schwankt die CO<sub>2</sub> Bildung bei gärenden (Abbildung 6.8) und auch bei atmenden Kulturen, wie auch die O<sub>2</sub> Aufnahme und die Ansäuerung des Kulturmediums. Wird die Zellteilung blockiert, laufen die anderen drei Rhythmen weiter ab. Sie sind also nicht eine direkte Folge des Zellteilungsrythmus. Eine ultradiane Uhr scheint also auch hier eine allgemeine Kontrolle von Stoffwechselfvorgängen auszuüben (Kippert and Lloyd (1995)).

### 6.3 Neurospora

*Neurospora* gehört zu den Ascomyceten. Der Pilz bildet ein Mycel, in dem die Zellen zu einem Syncytium verschmolzen

## 6 Rhythmen bei Amöben, Hefen und Pilzen

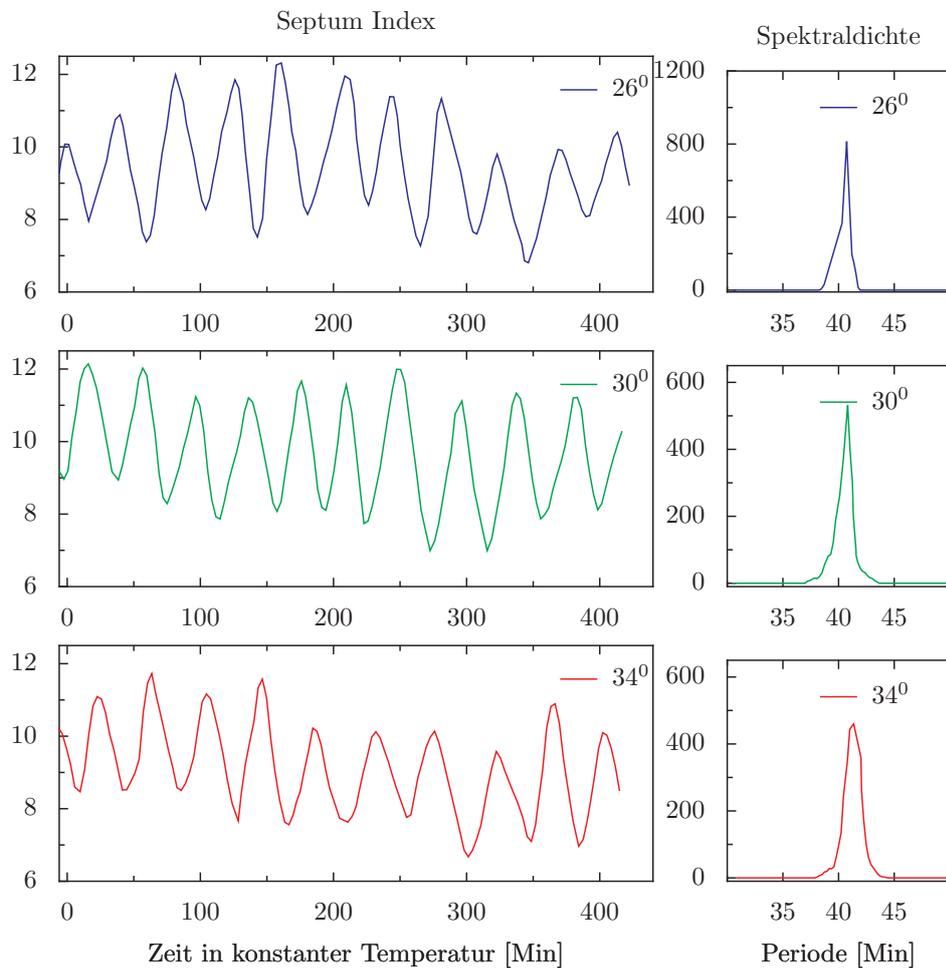


Abbildung 6.7: Zellteilung in *Saccharomyces pombe* Kulturen. Sie wurden zunächst durch Temperaturzyklen von 30 Minuten  $33^{\circ}$  und 15 Minuten  $27^{\circ}$  synchronisiert. Danach wurden die Kulturen in konstante Temperatur-Bedingungen von  $26^{\circ}$  (oberstes Diagramm),  $30^{\circ}$  (mittleres Diagramm) und  $34^{\circ}$ C (unteres Diagramm) überführt. Der Prozentsatz der Zellen, die eine Querwand bilden, wurde als Septum-Index bestimmt. Die Ergebnisse von Zeitreihen-Analysen mit Maximum-Entropie-Spektral-Analyse (MESA) sind rechts neben den Kurven dargestellt (Spektraldichte gegen Periodenlänge aufgetragen). Sie zeigen bei allen drei Temperaturen die gleiche Periodenlänge von etwas über 40 Minuten. Die Periodenlänge ist also unabhängig von der Temperatur des Mediums. Nach [Kippert and Lloyd \(1995\)](#)

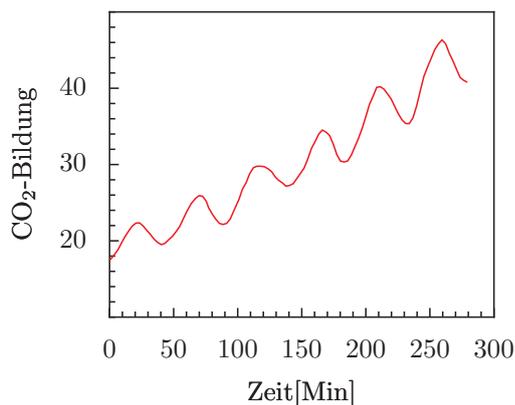


Abbildung 6.8: CO<sub>2</sub>-Bildung in einer gärenden *Saccharomyces pombe* Kultur bei 30°C nach 4 Temperatur-Zyklen von 30 Minuten 30° und 15 Minuten 26°C (nicht dargestellt). Gemessen wurde im 5 Minuten Abstand in drei verschiedenen unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden gemittelt und geglättet. Nach Kippert and Lloyd (1995)

sind. Es handelt sich also sozusagen um eine Riesenzelle.

Fadenförmige Pilze sind am engsten mit den Tieren verwandt, wie neuere Untersuchungen belegen (Wainright et al. (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 Weltweit verbreitet. Sein Entwicklungszyklus und Generationswechsel ist in Abbildung 6.9 beschrieben. Es gibt einen sexuellen und einen asexuellen Fortpflanzungszyklus. Ascosporen werden in Asci gebildet, die sich in

Perithezien befinden. Ferner werden von *Neurospora* auch asexuelle Konidien gebildet. Dazu differenziert sich das Mycel in Lufthyphen, die dann die Konidien formen.

### 6.3.1 Circadiane Rhythmen der Konidienbildung und anderer Vorgänge

Das Umschalten zwischen undifferenziertem Mycel und Lufthyphen wird tagesperiodisch gesteuert. Die Periodenlänge des Rhythmus beträgt beim Wildtyp 21.6 Stunden (Dunlap (1993)). Die Konidienbildung dient als Zeiger der circadianen Uhr und ist sehr einfach zu messen. 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 6.10). 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 6.11 und einen Videofilm wachsender *Neuro-*

<sup>1</sup>siehe jedoch Lakin-Thomas et al. (2001): Mit Zeitraffer-Video-Aufnahmen wurde gefunden, dass 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.

## 6 Rhythmen bei Amöben, Hefen und Pilzen

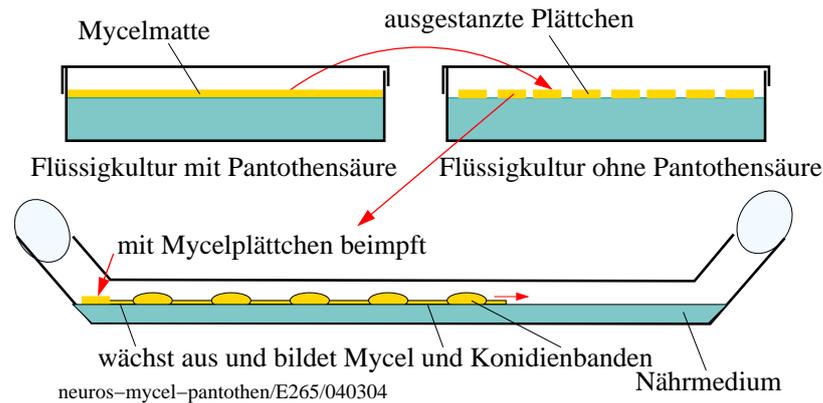


Abbildung 6.11: Circadiane Rhythmen laufen auch in Flüssigkulturen von *Neurospora crassa* ab. Eine Pantothenensäure-Mangelmutante wurde zunächst mit Pantothenensäure angezogen, bis sich auf der Oberfläche Mycelmatten gebildet hatten (oben links). Von diesen wurden mit einem Korkbohrer kreisförmige Stücke ausgestanzt und in Flüssigkultur ohne Pantothenensäure übertragen (oben rechts). Deshalb findet kein Wachstum statt. Trotzdem verläuft der circadiane Rhythmus weiter: Auf Agar eines Wachstumsröhrchens mit Pantothenensäure bilden sich circadiane Bänder (unten)

*Neurospora crassa* mit Protoplasmaströmung von der Fungal Genetics Stock Center's World Wide Web Site, <http://www.fgsc.net/>.

Allerdings ist dafür eine besondere Mutante, *bd*, nötig, die auch in geschlossenen Gefäßen Konidien ausbildet. Sonst würde nämlich durch das sich ansammelnde  $\text{CO}_2$  die Konidienbildung unterdrückt werden. Der Stamm *bd* wächst außerdem etwa 30% langsamer als der Wildtyp.

Bei konstanter Temperatur und in physiologischer Dunkelheit (schwaches Rotlicht) beträgt die Freilaufperiode 21 bis 22 h. Der Rhythmus ist zwischen  $18^\circ$  und  $30^\circ\text{C}$  Temperatur-kompensiert. Er lässt sich durch Lichtpulse verschieben.

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 sein. Außerdem schwanken einige Fettsäuren der Membranen tagesperiodisch.

Andere mit Differenzierungsvorgängen zusammenhängende Vorgänge werden circadian kontrolliert. Die Signale, die diese Stoffwechselforgänge und Differenzierungsvorgänge kontrollieren, sind noch nicht bekannt. Ein solches Signal könnte cAMP sein, das circadian schwankt (Hassunuma et al. (1987)). Die circadiane Uhr von *Neurospora* kann auch in Einzelzellen beobachtet werden (frisch gekeimte Konidiosporen, Lindgren (1994)).

### 6.3.2 Zeitgeber und Temperatur-Kompensation

Wie Lichtpulse können auch Temperaturpulse den circadianen Rhythmus von *Neurospora crassa* verschieben. Temperaturzyklen wirken bei *Neurospora* sogar stärker als Licht-Dunkel-Zyklen (Liu et al. (1998)).

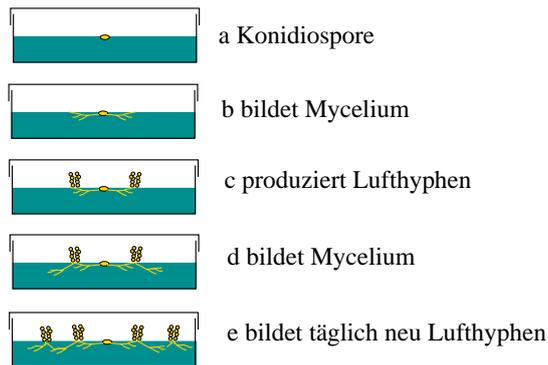
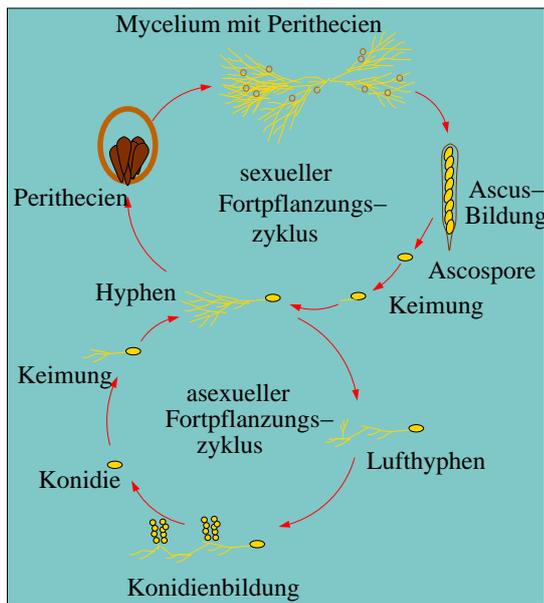


Abbildung 6.10: Konidiosporen von *Neurospora crassa* keimen und wachsen als Hyphen auf einem Substrat zu einem Mycel aus. Nach einiger Zeit werden Lufthyphen produziert, die aus dem Substrat als Konidiophoren heraus wachsen und Konidiosporen bilden. Danach wachsen sie wieder mit normalem Mycel auf dem Substrat, bis die nächsten Konidienbänder gebildet werden. Der Vorgang wiederholt sich täglich. Nach [Rensing \(1993\)](#)

Abbildung 6.9: Entwicklungszyklus und Generationswechsel von *Neurospora*. Oben: Sexueller Fortpflanzungs-Zyklus. Ascosporen werden in Ascii gebildet, die sich in Peritheciën befinden. Nach der Keimung bildet eine Ascospore ein Mycelium (coenocytisch, das heißt, viele Kerne im gemeinsamen Zytoplasma). Über Protoperitheciën bilden sich Peritheciën. In einem Perithecium werden Ascii gebildet, die Ascosporen verbreiten und aus denen wieder Mycelien werden. Damit ist der sexuelle Fortpflanzungszyklus abgeschlossen. Unten: Asexueller Fortpflanzungs-Zyklus. 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 [Springer \(1993\)](#)

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. Die circadiane Konidienbildung ist bei *Neurospora crassa* nur zwischen 18<sup>0</sup> und 30<sup>0</sup> Temperaturkompensiert ( $Q_{10} = 0.95$ ) ([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<sub>10</sub> 1.3.

Verschiedene Modelle wurden aufgestellt, um die Temperatur-Kompensation zu erklären. Nach Untersuchungen von [Dunlap et al. \(1998\)](#) ist sie das Ergebnis der Expression unterschiedlicher Mengen von zwei verschiedenen Arten von FRQ (sFRQ und IFRQ) bei höherer beziehungsweise niedrigerer Umgebungs-Temperatur ([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. Durch Phosphorylierung werden die beiden FRQ-Formen abgebaut.

### 6.3.3 Die circadiane Uhr von *Neurospora*

Wie kontrollieren circadiane Uhren die Genexpression und wie interagieren sie mit der Umwelt? Der Mechanismus, der diesen circadianen Rhythmen zugrunde liegen soll, wird im folgenden kurz besprochen. Er ist ziemlich kompliziert. Beim *Neurospora*-System interagieren circadiane Kontrolle, Kontrolle durch Licht, Stoffwechsel-Kontrollen und Kontrollen der Entwicklung miteinander.

Im folgenden werden zunächst einige der bekannten wesentlichen Komponenten des circadianen Uhrwerks vorgestellt.

Das Produkt FRQ der *frq*-mRNA des *frq*-Gens ist eins der Hauptspieler im circadianen Spiel von *Neurospora crassa*. Das *frq* Gen wurde kloniert und ist eine 7.7 kb DNA mit zwei Transkripten (4 und 4.5kb). Wird eins der beiden Transkripte deletiert, fällt die Funktion aus. FRQ ist bei *Neurospora* für die Periodenlänge und für die Temperaturkompensation der Uhr verantwortlich.

Zwei weitere Genprodukte sind wich-

tig, 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-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.

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 sich stark auf das produzierte Protein ausübt. WCC überträgt Licht-Signale auf Licht-empfindliche und Uhr-kontrollierte Gene (Pfeile auf *frq*, *wc-1* und *ccg* in Abbildung 6.13). 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. \(2001\)](#)).

Ein weiterer Spieler im circadianen System von *Neurospora* ist das VVD, ein Pro-

tein, das vom *vivid* Gen (*vvd*) transkribiert wird. 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 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 6.3.3).

Das Produkt FRQ des *frq*-Gens ist eine essentielle Komponente (eine Zustandsvariable) 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. (1994)). Das scheint bei circadianen Oszillatoren allgemein der Fall zu sein. Das zugrunde liegende Prinzip ist in Abbildung 6.12 als molekularer Rückkopplungs-Oszillator dargestellt.

Vor allem durch molekular-biologische Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Dunlap wurde ein spezifischeres Modell für die circadiane Uhr von *Neurospora* entwickelt, welches in Abbildung 6.13 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 (Aronson et al. (1994)).

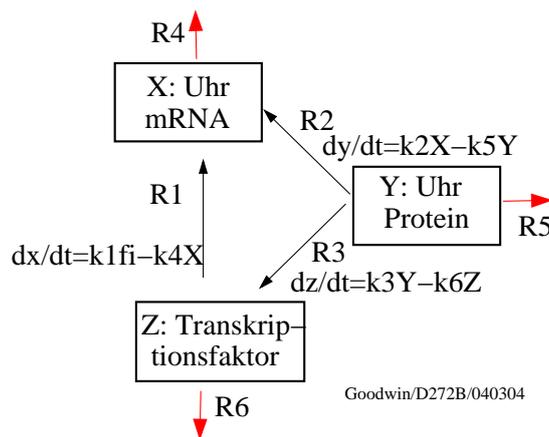


Abbildung 6.12: Molekularer Rückkopplungs-Oszillator nach Goodwin. Das Uhr-Protein Y hemmt seine eigene Transkription aus der Uhr-mRNA (X) über den Transkriptionsfaktor Z. Die Produktionsrate der Zwischenprodukte Y und Z sind lineare Funktionen der Konzentrationen von X beziehungsweise Y. Die X Produktion 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  $k_s$  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  $k_d$  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

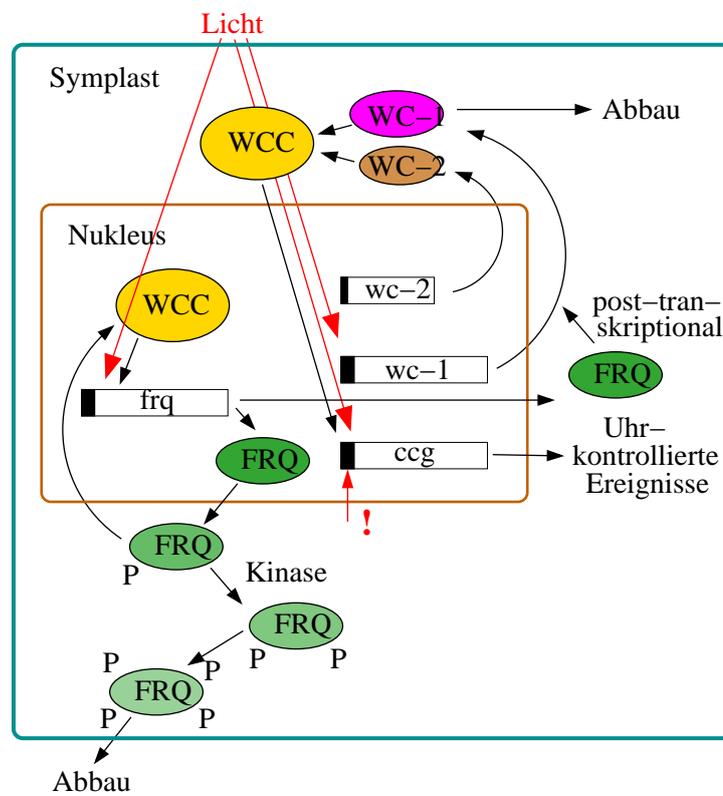


Abbildung 6.13: Modell des Rückkopplungs-Oszillators von *Neurospora crassa*. mRNA und FRQ Protein Produktion des *frq*-Gens sind Teile des Rückkopplungs- Systems im circadianen Uhrwerk. FRQ spielt mehrere Rollen. Es reguliert die *frq*-mRNA über trans-wirkende Faktoren circadian regulierter Elemente (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.

Außerdem wird die Wirkung des Lichts als dem wichtigsten Zeitgeber gezeigt. Licht beeinflusst die Transkription des *frq*-Gens, und das Protein WCC spielt eine Rolle für das Weiterleiten des Lichtsignals. In der späten Nacht und am frühen Morgen verfrüht ein Lichtpuls den Rhythmus. Das ist maximal, wenn viel *frq* mRNA vorhanden ist. Am späten Tag und in der frühen Nacht verzögert ein Lichtpuls den Rhythmus. Zu dieser Zeit nimmt die Konzentration von FRQ ab. Da jedoch der Lichtpuls zu mehr *frq* mRNA führt, dauert es länger, bis die mRNA und FRQ reduziert sind. Licht beeinflusst außerdem die Uhr-kontrollierten Gene (ccg's) auch direkt. WC-2 spielt dabei eine Rolle. Es wird im Dunkeln re-aktiviert. Nach [Dunlap et al. \(1998\)](#)

**Licht** beeinflusst das circadiane System, indem es die *frq* Expression über den WCC Komplex aktiviert. Der Komplex wird durch Dimerisierung des WC-1 und WC-2 Proteins gebildet. Abbildung 6.13 illustriert den Weg, auf dem Licht das Uhrwerk beeinflusst.

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. Das Modell 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 6.13).

WCC überträgt Lichtsignale auch auf Licht-empfindliche und Uhr-kontrollierte Gene (Pfeile auf *frq*, *wc-1* und *ccgs* in Abbildung 6.13, 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 das *vivid* Gen (*vvd*) am Spiel beteiligt. 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 6.14).

**Temperatureffekte** werden bei *Neurospora* durch post-transkriptionale Kontrolle erzeugt (Liu et al. (1998)). Wie erwähnt, werden während der Translati-

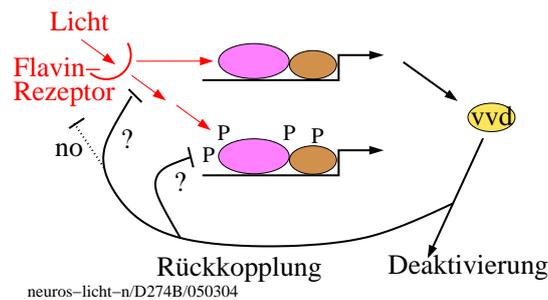


Abbildung 6.14: Das *vivid* Gen *vvd* wird durch Licht induziert, dass es über einen Flavin-Photorezeptor via Transkriptionsfaktor WCC (besteht aus WC-1, violett, und WC-2, braun, oben) empfängt. Es koppelt entweder über den Eingangsweg des Lichtes zurück auf den Transkriptionsfaktor WCC des *frq* Gens (Mitte) (rechtes ?) oder zum Lichtsignal-Transduktionsweg des Photorezeptors zum Transkriptionsfaktor WCC des *frq* Gens (linkes ?), 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 Linden et al. (1999)

on 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)).

Das Einstellen des Rhythmus durch eine Temperaturstufe reflektiert ebenfalls post-transkriptionale 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 6.15 illustriert).

**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 Rehman (1998), Lakin-Thomas (2000)). Es wurde vorgeschlagen, Transkription und Feedback des Proteins auf seine eigene mRNA-Bildung aus dem eigentlichen Oszillator herauszunehmen (Abbildung 6.16).

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 6.1) und stellt vielleicht einen Entwicklungsrhythmus dar.

### Wozu das circadiane System dient

Das circadiane System stellt eine zuverlässige Uhr dar, indem positiv und negativ wirkende Rückkopplungsschleifen verknüpft sind, die nicht nur die Periodenlänge der circadianen Uhr bestimmen, sondern ihr auch Robustheit und Zuverlässigkeit verleihen (Yang et al. (2001)). Diese Uhr ist nicht nur in der Lage, unter Dauerlicht oder Dauerdunkel und konstanten Temperatur-Bedingungen zu laufen und von ihr abhängige Ereignisse zu steuern, sondern muss in der Natur auch auf den 24 Stunden Tag synchronisiert werden. Sonst würde sie rasch mit dem Tag-Nacht-Zyklus außer Takt kommen und wäre nicht mehr zuverlässig. Dafür sind Photorezeptoren und Transduktions-Wege zur Uhr vorhanden. 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. Zusätzlich liefert der circadiane Uhr-Mechanismus von *Neurospora* eine Temperaturkompensati-

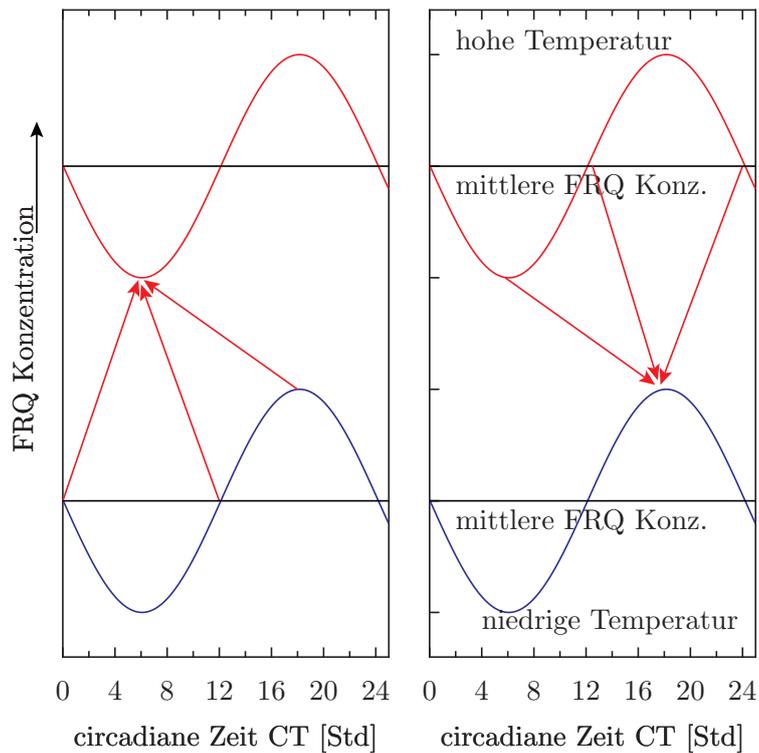


Abbildung 6.15: Die Uhr von *Neurospora* wird mit einer Temperaturstufe nach oben (links) auf Abend verschoben (rote Pfeile), wo das FRQ-Niveau niedrig ist (obere Kurve). Temperaturstufen nach unten (rechts) verschieben zu einer Morgenphase, wo das FRQ-Niveau hoch ist, und zwar unabhängig von der Phase des Zyklus, zu dem die Stufe erfolgt (Ursprung des jeweiligen roten Pfeils im rechten Teil). Nach [Dunlap \(1999\)](#)

## 6 Rhythmen bei Amöben, Hefen und Pilzen

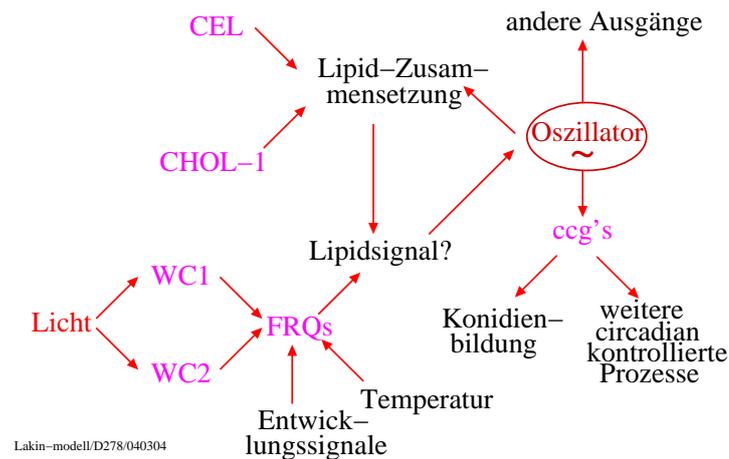


Abbildung 6.16: Nach Lakin-Thomas ist FRQ nicht direkt ein Bestandteil des circadianen Oszillators, sondern vielmehr ein Teil vor dem Oszillator. Licht wirkt über WC-1 und WC-2 auf FRQ (Temperatur und Signale der Entwicklung beeinflussen ebenfalls FRQ). FRQ beeinflusst den circadianen Oszillator über 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 \(1998\)](#)

on, die für eine zuverlässige Uhr wichtig ist.

Es wurde auch diskutiert, ob die jahresperiodische Sporenabgabe, die man oft bei Pilzen findet, auch bei *Neurospora* vorhanden ist und ob sie photoperiodisch kontrolliert wird (Roenneberg and Merrow (2001)).

### 6.3.4 Ausgänge der Uhr, Uhr-kontrollierte Gene

Die Ausgänge der Uhr und die Art, wie die beobachteten Rhythmen hervorgebracht werden, sind ebenfalls wichtige Teile des circadianen Systems. 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: Die Zahl der Hyphen und Lufthyphen, die Hyphenverzweigungen, Bildung eines Septums, das Abgeben reifer Konidien, Teilung des Kerns, 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. 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 schwankt circadian (Delmer and Brody (1975), Schulz et al. (1986)), die Menge der Hitzeschock-Proteine (Kallies et al. (1998)), und die Abgabe von Ascosporen wird gleichfalls circadian kontrolliert (Brody, unveröffentlicht). Die Periodenlänge entspricht der der Konidienbildung.

Gene, die auch unter konstanten Bedingungen rhythmisch mit einer Periodenlänge exprimiert werden, die dem Genotyp des Stammes entspricht, werden clock-controlled Genes ('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 6.17 und Loros and Dunlap (2001)). Inzwischen sind eine ganze Reihe von ccgs bekannt und viele werden hinzukommen, wenn differentielles Screening und Mikroarray-Analyse ver-

## 6 Rhythmen bei Amöben, Hefen und Pilzen

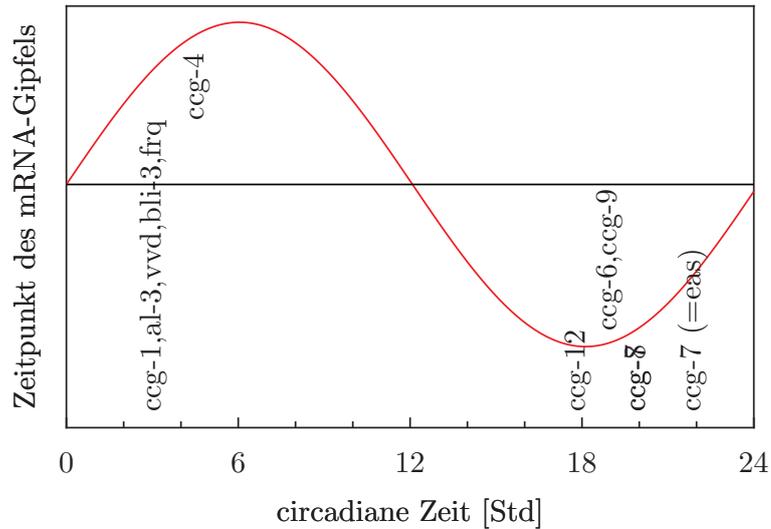


Abbildung 6.17: Maxima der mRNA verschiedener Uhr-kontrollierter Gene von *Neurospora*. Während der späten subjektiven Nacht und des frühen Morgens: ccg-1 (Identität unbekannt), al-3 Geranylgeranyl-Pyrophosphat Synthase, vvd (vivid, Lichtrepressor), bli-3 (Identität unbekannt), frq (Uhr-Komponente, transkriptionaler Co-Repressor) und ccg-4 (Identität unbekannt). Während des subjektiven Abends und der frühen Nacht: ccg-12 (oder cmt, Kupfer-Metallothionein, ccg-6 (Identität unbekannt) 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 \(2001\)](#)

wendet werden.

Wie diese Zeit von der Uhr abgelesen wird, ist noch nicht richtig verstanden.

## 6 *Rhythmen bei Amöben, Hefen und Pilzen*

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

Zelluhren lassen sich nicht nur an Einzellern untersuchen, sondern auch an Zellen von Geweben. In diesem Kapitel werden einige Beispiele für Rhythmen im Körper der Säuger vorgestellt. Im Gegensatz zu Einzellern sind die Zellen der Säuger wie die anderer Vielzeller spezialisiert, um Nahrung zu speichern und zu verdauen, toxische Substanzen unschädlich zu machen, um Bewegungen zu ermöglichen und vieles mehr. Sie bilden Gewebe (Muskeln, Fettgewebe) und Organe (Leber, Niere, Gehirn). Diese Zellen in Geweben und Organen besitzen circadiane Uhren (siehe Abbildung 7.2), deren Phasenlage zum Tag/Nacht-Rhythmus sich unterscheidet. Zeitgeber für die Gewebe können direkt wirken (Licht beim SCN) oder indirekt (Nahrung bei der Leber, Informationen vom SCN). Jedes Gewebe und jedes Organ hat sein eigenes Muster tagesrhythmisch transkribierender Gene<sup>1</sup> (Abbildung 7.1, Storch et al. (2007)). Es spiegelt die unterschiedlichen Aufgabe und Bedürfnisse der Organe wider und erlaubt, optimal unter den seit Millionen von Jahren existierenden rhythmischen Bedingungen der Umwelt zu funktionieren, indem diese periodischen Änderungen in einer inneren Uhr ablaufen. Diese Uhr koordi-

niert die Transkription von Genen für die wichtigsten Stoffwechselwege und dirigiert den Verlauf physiologischer Prozesse und des Verhaltens (Holzberg and Albrecht (2003)).

Wir werden im folgenden Zelluhren an verschiedenen Geweben der Säuger kennen lernen. Es soll gezeigt werden, wie komplexe Systeme (Stoffwechsel, Gehirn) mit den circadianen Zentren und der Umwelt interagieren. Es wird sich aber auch zeigen, dass manche Krankheiten auf einer systemischen Fehlfunktion beruhen (siehe Kapitel 8).

Im Hypothalamus des Gehirns ist ein Zentrum rhythmischer Steuerung, der suprachiasmatische Kern (SCN, siehe Abschnitt 7.1). Er kontrolliert zahlreiche Gebiete des Zentralnervensystems und des Körpers, sodass diese ihren circadianen Rhythmus an die optimalen Zeiten anpassen können. Der SCN wird über die Augen mit Informationen des Licht-Dunkel-Wechsels der Umwelt versorgt (siehe Abschnitt 7.3). Außerdem erhält er auch Informationen vom Körper über dessen Zustände und Erfordernisse (siehe Abbildung 7.2).

Zellen peripherer Gewebe können zwar circadiane Rhythmen generieren, werden aber nicht durch Licht direkt synchronisiert Schibler et al. (2003). Sie müssen deshalb durch nichtphotische Zeitgeber auf die richtige Zeit eingestellt werden. Die Nahrungsaufnahme ist dabei der wichtigste Zeitgeber. Füttern am Tage invertiert die Phasenlage der Expression circadianer

---

<sup>1</sup>nur etwa 10% der rhythmischen Gene sind wenigstens in einem anderen Gewebe zu finden, von dem bekannt ist, dass es Uhr-Gene enthält. Diese gemeinsamen Gene sind wahrscheinlich eng mit dem Uhr-Mechanismus verbunden oder stellen neuartige Uhrkomponenten dar (Untersuchungen von Duffield et al. (2002) mit Mikroarray-Technologie)

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

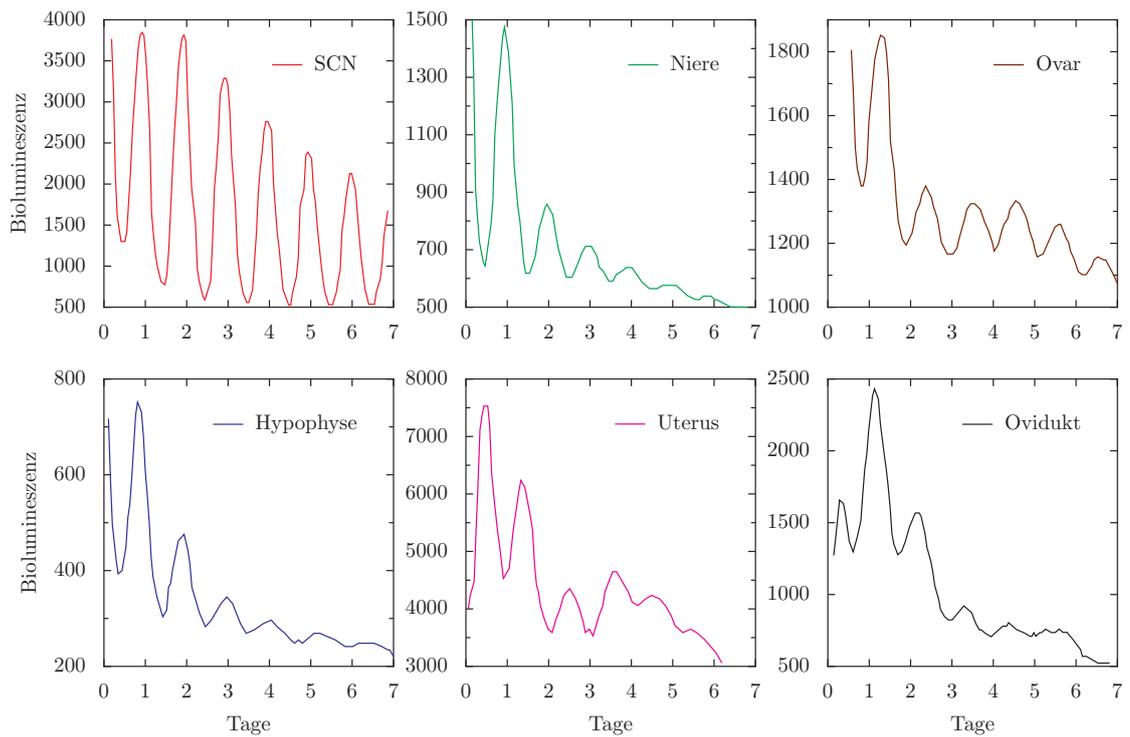


Abbildung 7.1: Circadiane Rhythmen in Zellen (mit eingeführtem *luc*-Gen) von verschiedenen Organen

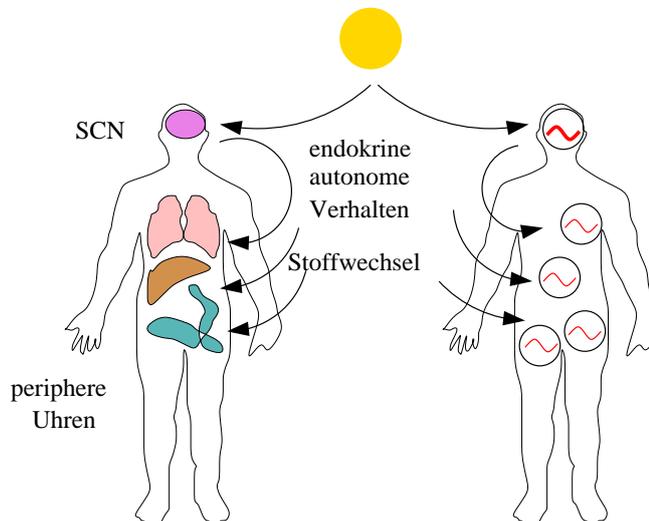


Abbildung 7.2: Die zentrale Uhr im SCN des Hypothalamus kontrolliert periphere Uhren in den Geweben und Organen des Körpers. Die Oszillatoren im SCN werden durch den Licht-Dunkel-Wechsel und andere Zeitgeber der Umwelt synchronisiert

Uhr-Gene bei Nacht-aktiven Nagern im Labor in vielen Geweben wie Leber, Niere und Herz, hat aber keinen Effekt auf den Rhythmus im SCN. Es ist deshalb zu vermuten, dass auch bei normalen Tieren der SCN die peripheren Uhren vor allem durch das Fressverhalten synchronisiert, das wiederum durch das Schlaf-Wach-Verhalten bedingt ist. Zusätzlich kann der Körpertemperatur-Rhythmus, der ebenfalls vom Muster der Nahrungsaufnahme abhängt, die Aktivität circadianer Uhr-Gene *in vivo* und *in vitro* synchronisieren.

Der SCN kann aber die Phasenlage der rhythmischen Genexpression im peripheren Gewebe auch über direkte chemische Signale bestimmen. Während der SCN nur in der Nacht auf Licht reagiert, können periphere Oszillatoren durch zahlreiche chemische Signale über den gesamten Tag hinweg beeinflusst werden. So startet Dexamethason, ein Antagonist der Glucocorticoid-Rezeptoren, den Rhythmus der Leber-Gen-Expression während des gesamten 24-Stunden Tages neu.

Es ist noch nicht geklärt, wie die vielen Rhythmen der peripheren Organe und Gewebe gekoppelt sind und ein kohärentes System bilden. Zu dieser Frage haben [Kurumiya and Kawamura \(1991\)](#) die elektrische Aktivität im SCN und außerhalb im lateralen und ventromedialen Hypothalamus gemessen. Blinde Ratten mit beidseitig zerstörtem SCN zeigten keinen circadianen Rhythmus der elektrischen Aktivität in den Hypothalamus-Regionen und keine lokomotorische Aktivität, wenn genügend Wasser und Futter zur Verfügung stand, wohl aber unter eingeschränktem Futterangebot. Ähnliches wurde an Meer-schweinchen gefunden ([Kurumiya and Kawamura \(1988\)](#)). [Stokkan et al. \(2001\)](#) untersuchten die Wirkung von zyklischem Füttern als starkem Zeitgeber auf die Gen-

expression in Leber, Lunge und im SCN. Sie verwendeten transgene Ratten, deren Gewebe Luciferase *in vitro* bildet. So konnte am Leuchten der Gewebe und Organe der Rhythmus gemessen werden. Er wurde im SCN weiterhin vom Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert, auf bestimmte Zeiten beschränktes Füttern verschob aber den Rhythmus der Leber innerhalb von zwei Tagen. Die Leber kann also unabhängig vom SCN und dem Licht-Dunkel-Zyklus durch Nahrung synchronisiert werden.

Wie die Oszillatoren im SCN die lokomotorische Aktivität und andere Ereignisse circadian kontrollieren, ist bisher nur unzureichend bekannt. [Guo et al. \(2005\)](#) benutzten Parabiose zwischen intakten Mäusen und solchen, deren SCN entfernt wurde. Es zeigte sich, dass nicht-neuronale Signale (Verhalten oder Blutgebundene) den circadianen Rhythmus der Gen-Expression in der Leber und der Niere aufrecht erhalten, aber nicht den im Herzen, der Milz und dem Skelettmuskel. Der SCN steuert also die Expression circadianer Rhythmen in unterschiedlichen peripheren Organen über verschiedene Wege ([Guo et al. \(2005\)](#), [Froy \(2007\)](#), [Froy et al. \(2008\)](#), [Guo et al. \(2006\)](#), [Hastings and Maywood \(2000\)](#), [Maywood et al. \(2007b\)](#), [Maywood et al. \(2007a\)](#)).

Wie stark die Rhythmen in peripheren Geweben und Organen sind, zeigt sich auch darin, dass sie durch Läsionen des SCN nicht verschwinden ([Grundschober et al. \(2001\)](#)). Sie sind aber nicht mehr mit dem LD synchronisiert. Das SCN ist also für die Synchronisation nötig, nicht aber für den Erhalt peripherer Rhythmen.

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

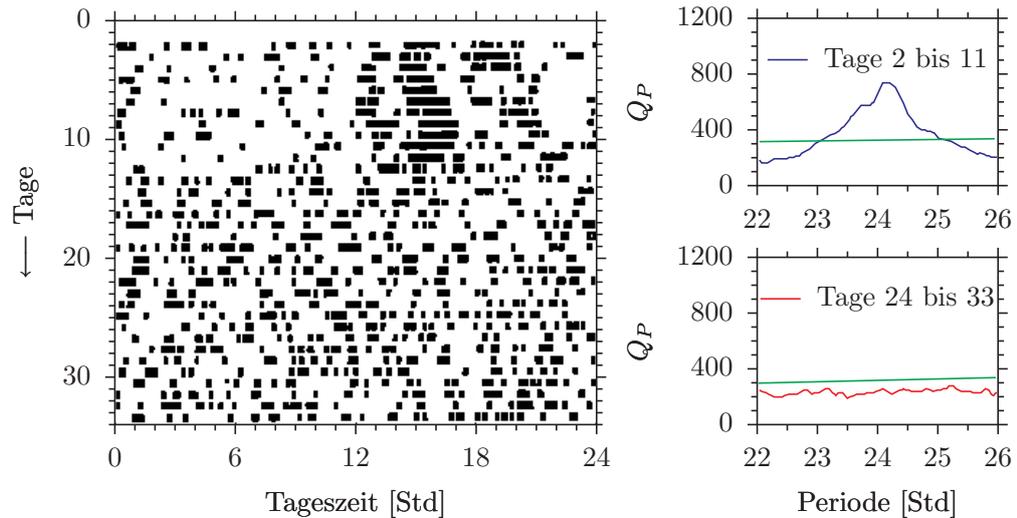


Abbildung 7.4: Einer Ratte wurde am 28. Tag des Freilaufs (Laufradaktivität) das SCN entfernt. Es wurde arrhythmisch, wie im Aktogramm (links) gezeigt. Rechts sind die Leistungsspektren für die prä-Läsionszeit (oben) und die post-Läsionszeit (unten) gezeigt. Der 25 Stunden Rhythmus, der vor der Läsion signifikant ist (blaues Maximum über der Signifikanzlinie), verschwindet (rote Kurve). Nach [Wollnik \(1995\)](#)

### 7.1 SCN und seine Ein- und Ausgänge

Bei allen Säugern wird das circadiane System vom SCN beherrscht. Es besteht aus einer paarigen Ansammlung von ca. 8000 bis 10000 Zellen im vorderen Teil des Hypothalamus (Abbildung 7.3). Er ist ein autonomer Rhythmus-Generator, der über Sekretion von Hormonen und über das parasympathische und sympathische Nervensystem wirkt ([Buijs et al. \(2003\)](#), [Buijs et al. \(2006\)](#)). Durch ihn wird nicht nur der Körper auf zu erwartende Änderungen im Aktivitätsrhythmus vorbereitet, sondern auch seine Organe auf die damit verbundenen Hormonabgaben. Neben dem Verhalten (lokomotorische Aktivität, Schlafen/Wachen) wird eine große Zahl physiologischer Prozesse (Körpertemperatur, [Ruby et al. \(2002\)](#), Winterschlaf [Ruby \(2003\)](#), Funktionen des Kreislaufs, und en-

dokrine Vorgänge ([Hastings et al. \(2007\)](#), [Haus \(2007\)](#), [Kriegsfeld and Silver \(2006\)](#), [Vollrath \(2002\)](#),) rhythmisch gesteuert. Wie wichtig der paarige SCN ist, zeigt sich, wenn dieser Teil des Hypothalamus zerstört oder entfernt wird. Die Tiere werden dadurch arrhythmisch. Sie zeigen aber wieder einen circadianen Rhythmus ihres Verhaltens, wenn ihnen fötales SCN-Gewebe implantiert wird ([Lehman et al. \(1987\)](#) und Abbildung 7.4 für Ratten). Dieses Gewebe kann auch von anderen Arten stammen (Goldhamster, Mäuse oder Ratten). Die induzierte Periodenlänge entspricht der des Donors (Goldhamster, Mäuse) ([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 und die deshalb arrhythmisch waren. Sie wurden dazu ins Gehirn an die Stelle implantiert, an der sich

## 7.1 SCN und seine Ein- und Ausgänge

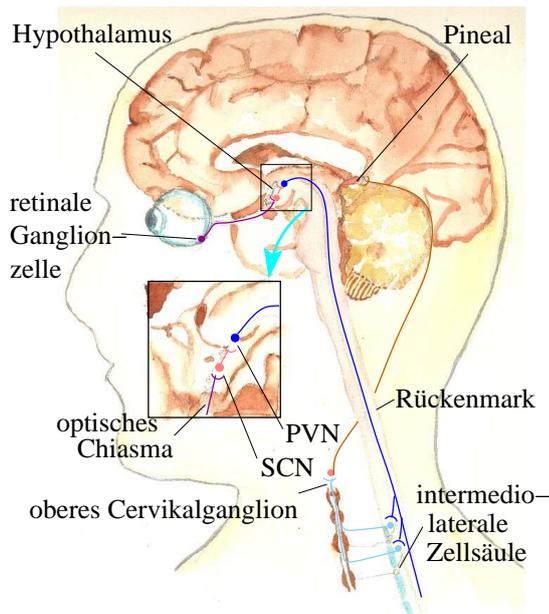


Abbildung 7.3: Übersicht der Verschaltungen von der Retina über den Retino-hypothalamischen Trakt zum SCN (magenta), von dort zum paraventriculären Nucleus (rosa) und (blau) zur intermediolateralen Zellsäule, zum oberen Zervikalganglion (hellblau) und (braun) zum Pinealorgan. Siehe auch Text. Nach Teikari (2006)

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 (Ralph et al. (1993)).

Der circadiane Rhythmus wird durch Uhr-Gene erzeugt, die durch negative und positive selbsterregte Transkriptions/Translations-Rückkopplungskreise zustande kommen. Zu diesen Uhr-Genen gehören Cryptochrome 1 und 2. Die Doppelmutante *mCry1/mCry2* zeigt deshalb kein rhythmisches Laufrad-Verhalten im Dauerdunkel. Neben der rhythmischen Cryptochrom-Expression fehlt auch das circadiane Feuern in SCN-Schnitten. Cryptochrom und damit ein intaktes circadianes Uhrwerk sind also für die circadiane elektrische Aktivität im SCN-Neuron nötig (Albus et al. (2002), siehe jedoch Yamanaka et al. (2007) und Fan et al. (2007)).

Zellen von neonatalem SCN von Ratten wurden zum Beispiel auf Mikroelektroden-Gittern kultiviert und die spontanen Aktionspotentiale von individuellen SCN-Neuronen über Tage und Wochen gemessen. Sie zeigten jeweils ausgeprägte Rhythmen, die aber trotz zahlreicher funktioneller Synapsen nicht miteinander synchronisiert waren (Inagaki et al. (2007)). Nach reversibler Blockade der Aktionspotentiale über 2.5 Tage traten die Rhythmen im Feuern mit der gleichen Phase wieder auf, die sie vorher hatten. Der SCN enthält also circadiane Oszillatoren in den einzelnen Zellen. Die in vitro gebildeten Synapsen sind weder für das Funktionieren der

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

Oszillatoren nötig noch werden sie zum Synchronisieren gebraucht.

Herzog et al. (1997) benutzten Multi-mikroelektrodenplatten, um extrazelluläre Aktionspotentiale gleichzeitig an verschiedenen Stellen der kultivierten SCN-Zellen von Mäusen zu messen. Neuronen innerhalb des isolierten SCN zeigten für Wochen circadiane Rhythmen im spontanen Feuern. Die gleiche Methode wendeten Welsh et al. (1995) an. Auch sie konnten an einzelnen SCN-Neuronen in Kulturen elektrische Aktivitäten für längere Zeit messen. Innerhalb einer Kultur gab es Zellen mit unterschiedlichen Phasen und Perioden, obwohl sich funktionelle Synapsen gebildet hatten (Kohsaka and Bass (2007)). Klisch et al. (2006) untersuchten das elektrische Feuern von einzelnen SCN-Neuronen ein bis drei Tage alter Ratten mit Multi-Mikroelektroden. Wenn die Zelldichte in der Kultur niedrig ist, zeigen die einzelnen SCN-Neuronen unterschiedliche circadiane Phasen. In diesen Fällen wurde nur selten synchrones Feuern durch benachbarte Elektroden beobachtet. Die SCN-Neuronen fungieren also als selbständige Schrittmacher. Melatoninpulse konnten in einzelnen Uhrzellen ohne Verbindung zu anderen Neuronen die Phase des Rhythmus verschieben. Solche Verschiebungen geschahen auch zu Zeiten, zu denen der Puls in SCN-Schnitten keine Phasenverschiebungen bewirkte. Das neuronale Netzwerk spielt also bei den Phasenverschiebungen eine große Rolle.

Die Zellen des SCN interagieren mit vasoaktivem intestinalen Polypeptid (VIP) über VPAC(2)-Rezeptoren. Mäuse, die keine funktionsfähigen VPAC(2)-Rezeptoren haben, zeigen keine Rhythmen im Verhalten und keine Rhythmen in elektrischen Signalen in SCN-Kulturen (Brown et al.

(2007)).

Es muss noch auf zwei Fragen eingegangen werden. Wie bildet sich der Aktivitätsrhythmus bei Tag- und bei Nachtaktiven Tieren heraus? Und wie können Tiere die Tageslänge messen, um darauf photoperiodisch zu reagieren (zum Beispiel mit Winterschlaf, wenn die Tage im Herbst kurz werden)? Zunächst zur ersten Frage. Der Schlaf-Wach-Rhythmus von fötalen und jungen Ratten wurde postnatal an P2<sup>2</sup>, P8, P15 und P21-Tieren gemessen. Unterschiede in der Schlaf-Wach-Aktivität gab es bereits in P2. Die Nachtaktivität entwickelte sich um P15 und war zuverlässig bei P21-Tieren ausgeprägt. Um zu prüfen, ob der Prozess der Licht-Synchronisation, der im Lauf der ersten postnatalen Woche stattfindet (in der sich die Verbindungen zwischen dem retinohypothalamischen Trakt und dem SCN bilden), dazu führt, dass die Tiere später nachtaktiv werden, wurden P3 und P11 Ratten beidseitig geblendet, also vor und nach der Synchronisation durch Licht. Während die P11 Tiere, die zu P21 getestet wurden, nachts stärker aktiv waren, so wie die Kontrolltiere mit Sham-Operation, zeigten die P3 Tiere, die ebenfalls zu P21 getestet wurden, stärkere Aktivität am Tage. Zu P28 und P35 getestete Tiere behielten dieses Tagesmuster. Prä- und postnatale Erfahrung führen also zu den Art-spezifischen circadianen Schlaf-Wach-Mustern. Wenn das visuelle System über den RHT mit dem SCN in Kontakt tritt, wirkt das auf die Organisation des sich entwickelnden circadianen Systems. Das führt dann zur Nachtaktivität dieser Tiere (Gall et al. (2008)).

Der Stoffwechsel im SCN verläuft tagesrhythmisch (Schwartz and Gainer (1977)) und ist unabhängig davon, ob die Tiere

<sup>2</sup>Alter der Tiere in Tagen

tag- oder nachtaktiv sind, am Tage stark, nachts schwach. Dieser Rhythmus läuft auch im isolierten SCN in vitro ab (Newman and Hospod (1986)).

Bevor wir auf die zweite Fragen eingehen, wie die Tiere die Tageslänge messen können, um darauf photoperiodisch zu reagieren, müssen wir uns die Struktur des SCN genauer ansehen. Er besteht aus einem Kern und einer Schale<sup>3</sup> mit charakteristischen Neurotransmittern ihrer Neuronen (Reuss (2003), Meijer and Schwartz (2003)), mit unterschiedlicher Innervierung (Übersicht Bartness et al. (2001), Esseveldt et al. (2000), Abbildung 7.5) und mit verschiedenen Funktionen: Die Oszillatoren in der Schale des SCN reagieren auf Licht-bedingte Signale der Retina, während die Oszillatorzellen des Kerns das nicht tun. Die Kern- und Schale-Oszillatoren sind aber miteinander gekoppelt und haben dadurch den gleichen Takt (die gleiche Phasenbeziehung). Die elektrophysiologische Aktivität *horizontal* geschnittener Scheiben eines Hamster-SCN zeigt zwei spezifische oszillierende Komponenten (Jagota et al. (2000)). Sie könnten die Aktivität eines *Morgen-* und eines *Abend-Oszillators* widerspiegeln, was bereits früher aus Verhaltensstudien geschlossen wurde (Pittendrigh and Daan (1976), Illnerova and Vanecek (1982)). Bei nachtaktiven Nagern würde der Morgenoszillator das Ende der aktiven Zeit einläuten und durch die Morgendämmerung synchronisiert werden, während der Abendoszillator die Aktivität startet und von der Abenddämmerung getaktet wird (Inagaki et al. (2007)). Damit ließe sich erklären, wie Verhaltensrhythmen ihre Phasenbeziehung zum Tag/Nacht-Rhythmus

beibehalten können, obwohl sich in den gemäßigten und höheren Breitengraden die Tageslänge im Verlauf des Jahres ändert. Auch photoperiodische Reaktionen könnten damit erklärt werden.

Wie sind diese individuellen Oszillatoren im SCN organisiert? Dazu wurden von Inagaki et al. (2007) quantitative Bildanalysen mit Zeitraffer durchgeführt, bei denen in Gehirnschnitten ein grünes fluoreszierendes Protein (GFP) mit kurzer Halbwertszeit als Reporter für das circadiane Uhr-Gen *period1* (*per1*) verwendet wurde. *Per1*-Promoter-Rhythmen wurde auf der Ebene des SCN und in individuellen Neuronen im SCN registriert und das zeitliche Muster im Licht-Dunkel-Zyklus und im Dauerdunkel bestimmt. Zusätzlich wurden Patch-Clamp Methoden an einzelnen Neuronen durchgeführt, um elektrophysiologisch die Beziehung zwischen *Per1*-Gen-Expression und der neurophysiologischen Reaktion zu zeigen. Sowohl im LD als auch im DD ist der Gesamt-Rhythmus des SCN aus individuellen Zell-Rhythmen zusammengesetzt, die ihre Maxima in distinkten Gruppen mit 3 bis 4 stündigen Unterschieden in der Phase haben. Die Phasenbeziehung zwischen der *Per1*-Schwingung und der lokomotorischen Aktivität und die Phasenbeziehung zwischen den individuellen neuronalen Oszillatoren im SCN unterscheiden sich im LD und DD.

Die Oszillatoren im hinteren SCN war unter drei Photoperioden (LD 18:6, 12:12 und 6:18) mit dem Ende der Aktivität gekoppelt. Die Oszillatoren im vorderen SCN waren hingegen mit dem Beginn der Aktivität gekoppelt, zeigten aber ein bimodales Muster in der langen Photoperiode (18:6). Das wird durch zwei Zellgruppen circadianer Oszillatoren mit einer frühen beziehungsweise späten Phasenlage

<sup>3</sup>zur topografischen Anordnung siehe Yamaguchi et al. (2003)

bewirkt. Im LD 12:12 und LD 6:18 war das Muster unimodal. Es gibt also drei Oszillatorgruppen im SCN, von denen mindestens zwei bei photoperiodischen Reaktionen beteiligt sind (Inagaki et al. (2007)).

### 7.1.1 Eingänge des SCN

Licht wird im Säuger über die Retina der Augen als Signal über den retinohypothalamischen Trakt (RHT, Abbildung 7.13) zur Schale des SCN geleitet. Es synchronisiert die dortigen Neuronen, deren Feuern unter circadianer Kontrolle steht.<sup>4</sup>

Neben dem RHT gibt es einen weiteren Eingang zum SCN, der von Neuropeptid Y (NPY)-enthaltenden Neuronen des intergenikulaten Blattes des lateralen genikulären Komplexes gebildet wird (Shibata and Moore (1993)). Dieser Strang endet im dorsomedialen Teil, dem Kern des SCN. Seine Eingänge stammen aus visuellen Quellen und die Neuronen zeigen deshalb Rhythmen, die Lichtunabhängig sind (Referenzen in Iyata et al. (1999)). Stimulation dieser Nerven oder NPY-Infusion im SCN intakter Tiere ergibt Phasenverschiebungen, die sich von denen des RHT unterscheiden, aber denen ähneln, die Störungen der lokomotorischen Aktivität hervorrufen. Phasenverschiebungen des circadianen Rhythmus im SCN werden also durch Aktivierung zweier verschiedener Eingänge hervorgerufen und ihre physiologische Wirkung auf die Oszillatoren im SCN unterscheidet sich stark.

<sup>4</sup>Elektrische Reizung des optischen Nerven oder des Chiasmas aktiviert den RHT und führt zu Phasenverschiebungen in der Aktivität der SCN-Neuronen von Hypothalamus-Scheiben in vitro. Die Phasenresponsekurve ist der von intakten Tieren im Dauerdunkel sehr ähnlich, wenn ihr circadianer Rhythmus mit Lichtpulsen verschoben wird (Shibata and Moore (1993))

Rhythmische Informationen werden aber auch über diffundierende Substanzen übertragen.

Von den Ausgängen des SCN sind die Projektionen zum Pinealorgan gut bekannt. Synthese und Sekretion des Melatonins im Pinealorgan wird durch den SCN circadian kontrolliert (siehe Abschnitt 7.4 und Simonneaux and Ribelayga (2003)).

### 7.1.2 Ausgänge des SCN

Die Ausgänge der Signale vom SCN zum Hypothalamus benutzen sowohl neuronale als auch hormonelle Mechanismen zur Kommunikation. Das gilt auch für den paraventriculären Kern, einem wichtigen Zentrum zur Integration neuroendokriner, homöostatischer und autonomer Funktionen, wie Untersuchungen von Tousson and Meissl (2004) zeigten. Sie maßen die elektrische Aktivität von SCN-Neuronen mit Elektroden und verglichen sie mit der von Strukturen außerhalb des SCN (zur Anatomie siehe Abbildung 7.7). Beide hatten die gleiche Phasenlage. Wurden die SCN entfernt, ging der Rhythmus im Hypothalamus verloren. Er konnte aber wieder durch implantierte SCN hergestellt werden. Da dann die neuronalen Verbindungen fehlten, musste ein hormoneller Faktor verantwortlich sein für den wieder beobachteten Rhythmus. Periodische Gabe von Arginin-Vasopressin (AVP) kann den Rhythmus im Hypothalamus wiederherstellen.

Die Ausgänge des SCN wurden auch von Yamazaki et al. (1998) untersucht. Die neurale Aktivität wurde mit multiplen Elektroden im SCN an frei beweglichen Goldhamstern untersucht und mit der Laufradaktivität im LD und Dauerdunkel verglichen. Der circadiane Rhyth-

## 7.1 SCN und seine Ein- und Ausgänge

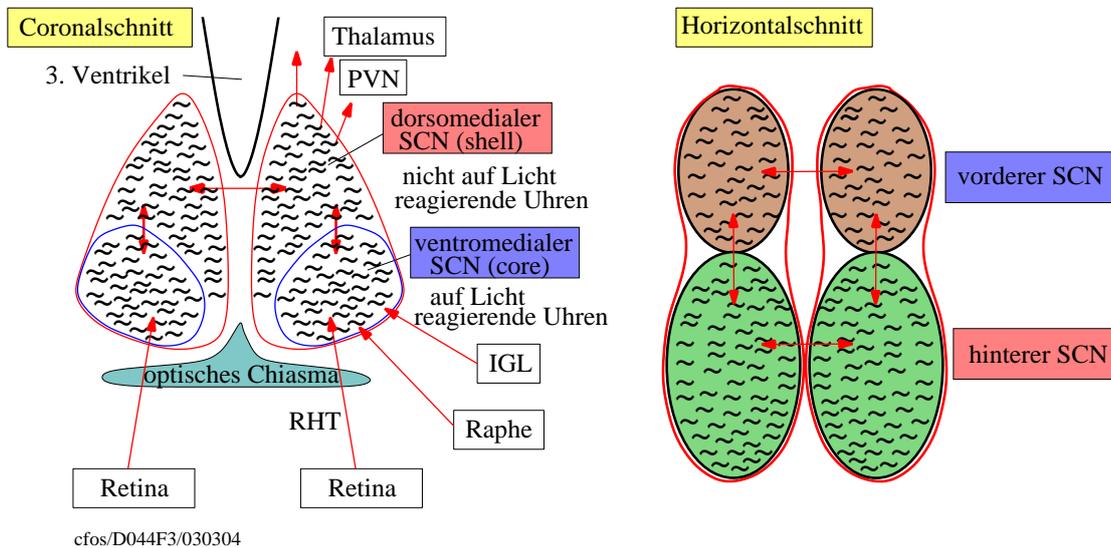


Abbildung 7.5: Links: Die suprachiasmatischen Kerne (SCN) der Säuger sind paarige Strukturen an der unteren Spitze des dritten Ventrikels und über ('supra') dem optischen Chiasma im Hypothalamus. Ein Coronarschnitt durch das SCN zeigt einen dorsomedialen Teil ('shell') und einen ventrolateralen Teil ('core'). Eingänge kommen von der Retina über den retinohypothalamischen Trakt (RHT), den Raphekern und das intergenikuläre Blatt (IGL). Ausgänge ziehen zum Thalamus, dem paraventriculären 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.

Rechts: Ein Horizontalschnitt zeigt das vordere SCN (braun), welches aus einer Population von Zellen besteht, die Morgen-Oszillatoren darstellen, und aus dem hinteren SCN (grün), die Abendoszillatoren repräsentieren. Kopplung zwischen den verschiedenen Gruppen ist durch die Doppelpfeile angedeutet. Nach [Shigeyoshi et al. \(1997\)](#), und [Dunlap \(2000\)](#)

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

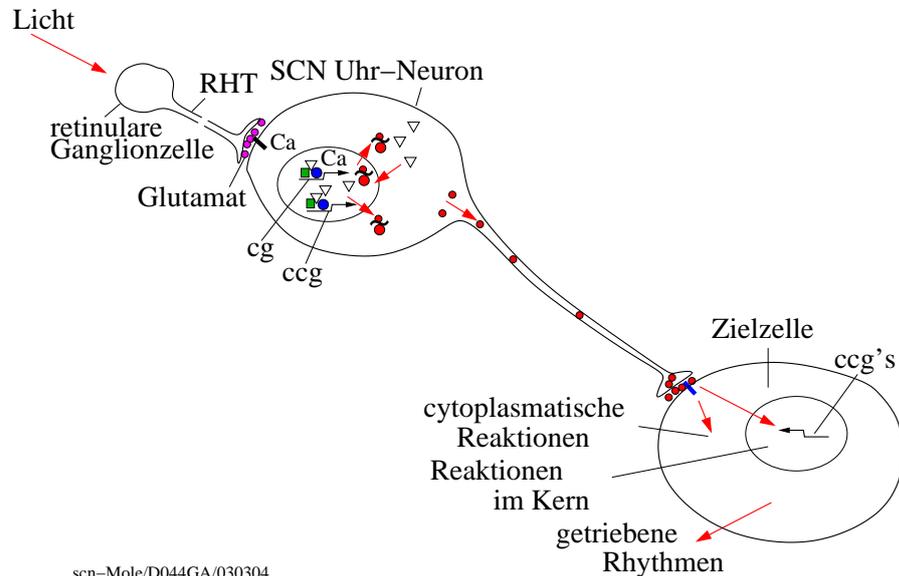


Abbildung 7.6: Ereignisse zwischen Lichtaufnahme, SCN Uhren-Neuronen und Zielzelle: Licht wird in Ganglienzellen der Retina aufgenommen. Neurotransmitter Glutamat (violett) wird abgegeben und reagiert mit Rezeptoren (schwarzes Rechteck). Über einen negativen Rückkopplungskreis mit Verstärkungsfaktoren CLOCK (grün) und BMAL (blau) wird die Expression von *mPer* und *mCry* der Uhr-Gene (*cg*) in Gang gesetzt. Dabei ist auch  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt. Uhr-Protein-mRNA (rote Kreise mit ~) wird produziert, verlässt den Kern und synthetisiert Uhr-Protein (Dreiecke) im Zytoplasma. Dieses gelangt in den Kern, interagiert mit mPER und erleichtert seine Translation, indem es die CLOCK-(grün) und BMAL-(blau) abhängige Transkription blockiert: Die mRNA Konzentration sinkt. Mit Zeitverzögerung werden negativ wirkende Komplexe inaktiviert und die Genexpression beginnt wieder. Die nächste Runde negativ und positiv wirkender Faktoren kurbelt die rhythmische Expression der Uhr-kontrollierten Gene (*ccg's*) an. Ihr Produkt, Uhr-kontrollierte Proteine, geben Informationen über die Tageszeit an die SCN-Neuronen und, über synaptische oder parakrine Signale, an Zielzellen weiter. Ziel-spezifische circadiane Ausgänge über cytoplasmische Reaktionen oder Reaktionen im Kern beeinflussen sekundäre *ccg's*. Ein Beispiel ist die N-Acetyltransferase. Sie kontrolliert die Melatoninsynthese. Nach [Hastings and Maywood \(2000\)](#)

## 7.1 SCN und seine Ein- und Ausgänge

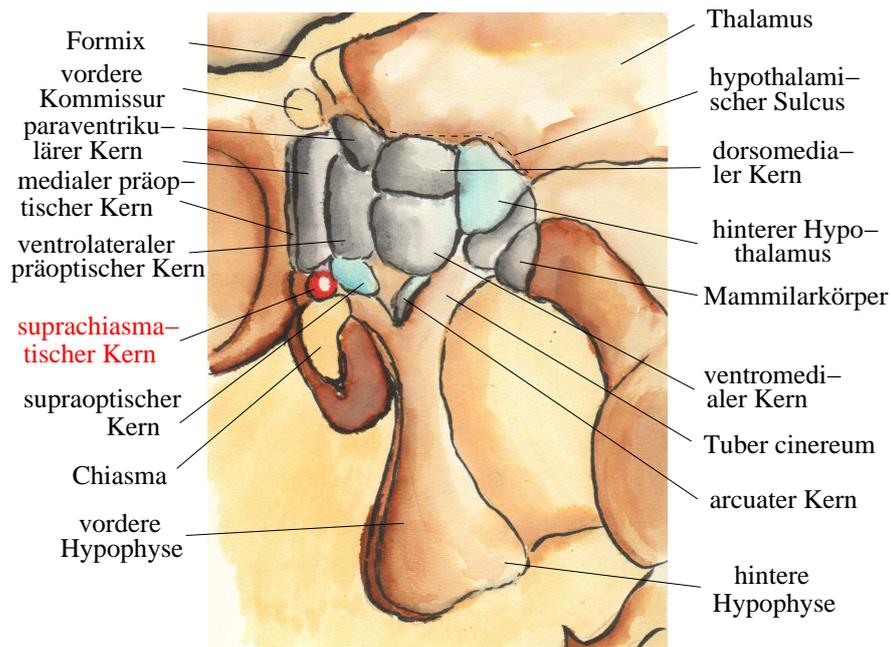


Abbildung 7.7: Die suprachiasmatischen Kerne (SCN) der Säuger sind paarige Strukturen an der unteren Spitze des dritten Ventrikel und über ('supra') dem optischen Chiasma im Hypothalamus. Unterhalb des Hypothalamus befindet sich die Hypophyse, oberhalb der Thalamus. Nach [Teikari \(2006\)](#)

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

mus war beim Wildtyp in beiden Fällen etwa 24 Stunden lang und bei der homozygoten tau Mutante 20 Stunden. Neuronale Aktivitätsrhythmen wurden auch außerhalb des SCN im ventrolateralen thalamischen Kern, dem caudaten Putamen, dem Accumbenskern, dem medialen und dem lateralen Septum, dem ventromedialen hypothalamischen Kern, der medialen präoptischen Region und der Stria medullaris gemessen. Alle diese Rhythmen waren außer Phase mit dem elektrischen Rhythmus im SCN, aber in Phase mit dem Rhythmus der lokomotorischen Aktivität und hatten das Maximum während der Nacht. Neben den circadianen Rhythmen gab es auch ultradiane Rhythmen. Der eine mit einer Periode von etwa 80 Minuten war in Antiphasse mit einem entsprechenden ultradianen Rhythmus im SCN und ein anderer mit etwa 14 Minuten war in Phase mit dem im SCN. Die Perioden dieser ultradianen Rhythmen waren beim Wildtyp und der tau-Mutante gleich. Der Bett-Kern der Stria terminalis (BNST) scheint besonders eng mit dem SCN gekoppelt zu sein, denn sowohl die circadiane als auch die ultradiane Komponente war immer in Phase. Außerdem wurde die elektrische Aktivität im BNST und im SCN unterdrückt, wenn der Hamster im Lauf rad lief, während die Aktivität in anderen Gebieten verstärkt wurde. Wahrscheinlich handelt es sich hier um einen Hauptausgang des SCN.

Ein weiterer wichtiger Ausgang des SCN geht zur subparaventriculären Zone (SPZ, siehe Abbildung 7.7). [Lu et al. \(2001\)](#) untersuchten dessen Bedeutung bei circadianen Vorgängen wie Schlaf, Körpertemperatur und Aktivität bei Ratten. Sie verwendeten eng begrenzte Läsionen im ventralen oder dorsalen SPZ durch Ibotensäure, ohne den unmittelbar benachbar-

ten paraventriculären hypothalamischen Kern (PVH) und den SCN zu beeinflussen. Ventrale SPZ-Läsionen reduzierten den circadianen Index des Schlafes um 90% und den der lokomotorischen Aktivität um 75%, während der circadiane Index des Körpertemperatur-Rhythmus nur um die Hälfte verringert wurde. Dorsale SPZ-Läsionen verringerten dagegen den circadianen Index der Körpertemperatur um 70%, den der lokomotorischen Aktivität nur um 45% und den des Schlafes nur um 5%. Stattdessen traten ultradiane Rhythmen von etwa 3 Stunden bei der Körpertemperatur und des Schlafes auf. Läsionen des PVH direkt dorsal vom SPZ beeinflussten keinen der gemessenen circadianen Rhythmen und auch die Basistemperatur wurde nicht verändert. Hingegen schwächte sich bei Läsionen des PVH die Fieberreaktion auf Injektion von Lipopolysaccharid stark ab. Der circadiane Rhythmus des Schlafes und der Körpertemperatur wird also von unterschiedlichen neuronalen Populationen im SPZ gesteuert.

Eine andere Projektion des SCN wurde von [Terazono et al. \(2003\)](#) an Mäusen untersucht. Es gibt polysynaptische Verbindungen zwischen dem SCN und der Leber. Um zu klären, ob das sympathische Nervensystem beteiligt ist, wurde Adrenalin/Noradrenalin in den SCN injiziert oder der sympathische Nerv stimuliert und geprüft, ob mPer-Gen in der Leber exprimiert wird. mPer1-, aber nicht mPer2 wurde gebildet, und zwar in vivo und in Leberschnitten in vitro. Elektrische Stimulation des sympathischen Nervs oder Adrenalininjektion erhöhte die Biolumineszenz in der Leber bei transgenen Mäusen mit mPer1-Promoter-Luciferase. Wurde der SCN zerstört, flachte der Tagesrhythmus der mPer1-, mPer2- und der mBmal1-Gene ab. Auch der Noradrenalin-

## 7.1 SCN und seine Ein- und Ausgänge

Rhythmus der Leber dämpfte aus. Durch tägliche Injektion von Adrenalin zu einer bestimmten Tageszeit für 6 Tage konnte am 7. Tag wieder ein Rhythmus der *mPer2*- und *mBmal1*-Gen-Expression in der Leber der Mäuse mit SCN-Läsion beobachtet werden. Ausschaltung des sympathischen Nerven durch 6-Hydroxy-Dopamin flachte den Tagesrhythmus der *mPer1*- und *mPer2*-Gen-Expression ab. Aktivierung des sympathischen Nervs durch Noradrenalin- und/oder Adrenalin-Abgabe war also ein Faktor, der die periphere Uhr kontrollierte.

Wenig ist auch bekannt über Informationen von der Peripherie des Körpers zum SCN. Das circumventriculäre Organ im Gehirn hat wie der ventrikuläre Bereich nur eine unvollständige Blut-Hirn-Schranke. Neuronen in diesem Bereich können deshalb chemische Verbindungen im Blut wie zum Beispiel Peptidhormone erkennen, ohne auf spezielle Transportsysteme angewiesen zu sein, die diese Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke bringen. Im ventrikulären und circumventrikulären Organ wirken eine Reihe von Hormonen, Neurotransmittern und Cytokinen oder werden hier sekretiert. Auch das Pinealorgan, der Hypothalamus und die Hypophyse liegen im circumventrikulären Bereich. [Buijs et al. \(2006\)](#) untersuchten den arcuaten Nukleus im Hypothalamus, der für die Homöostase der Energie zuständig ist und Lang- und Kurzzeit-Signale von Hunger und Sättigung integriert. Rezeptoren für Insulin, Leptin und Ghrelin nehmen hier Information von der Peripherie auf und geben sie an das Zentralnervensystem weiter. Neuroanatomische Studien mit Injektionen von retrograden und anterograden Tracern in den arcuaten Nukleus und in den SCN zeigen beidseitige Verbindungen des arcua-

ten paraventriculären Kerns (Abbildung 7.7) und des SCN, in denen Signale zum SCN gelangen, die mit der Nahrung zu tun haben.

Bisher wurde angenommen, dass das circadiane System der Säuger aus dem zentralen Oszillator, dem SCN, und untergeordneten Oszillatoren in den meisten peripheren Geweben und Organen besteht. Während die SCN-Neuronen selbsterregende Oszillatoren darstellen, wurde geglaubt, dass die Rhythmen der peripheren Oszillatoren rasch ausgedämpft, wenn sie nicht mehr unter der Kontrolle des SCN stehen. Vielleicht dämpft aber nicht der Rhythmus in den einzelnen Zellen aus, sondern die Zellen desynchronisieren miteinander. [Welsh et al. \(2004\)](#) haben deshalb die circadiane Uhr individueller Ratten-Fibroblasten für bis zu zwei Wochen beobachtet und gezeigt, dass sie ungedämpft weiter läuft. Medienwechsel zu Beginn der Messungen synchronisierte die Rhythmen zunächst, aber weil die Perioden der einzelnen Zellen variierten, würde das in der Population nach einigen Tagen zur Dämpfung führen. Auch benachbarte Zellen in der Kultur hatten unterschiedliche Phasen, woraus zu schließen ist, dass die Zellen nicht funktionell gekoppelt sind<sup>5</sup>. Auch [Nagoshi et al. \(2004\)](#) zeigten, dass NIH3T3 Maus-Fibroblasten selbsterregende und Zell-autonome circadiane Uhren enthalten wie die der SCN Neuronen. Die circadiane Gen-Expression der Fibroblasten setzte sich auch während

---

<sup>5</sup>[Rougemont and Naef \(2007\)](#) haben ein Modell entwickelt, in dem die Dämpfung als Desynchronisation der einzelnen Oszillatoren erklärt wird. Es basiert auf stabilen Grenzyklen (Steifheit der individuellen Frequenzen), Schwankungen der Perioden und der interzelluläre Kopplungsstärke. Letztere ist zu schwach, um die Zellen zu synchronisieren

der Zellteilung fort, und der Oszillator bestimmt die Zeiten der Cytokinese.

### 7.2 Astrocyten

Astrocyten (Astroglia) sind Stern-förmige Gliazellen im Gehirn und im Rückenmark (siehe Abbildung 7.8). Im Gehirn gibt es davon zehn mal mehr als Nervenzellen. Sie sind miteinander elektrisch verbunden, geben dem Gehirn Struktur, unterstützen den Stoffwechsel und die Aktivität der Nervenzellen, regulieren die Ionenkonzentration des extrazellulären Raumes<sup>6</sup>, bilden Plasmamembran-Transporter für Neurotransmitter wie Glutamat, ATP und GABA und können diese in Vesikeln abgeben. Astrocyten reparieren und vernarben das Gehirn nach traumatischen Verletzungen und phagozytieren abgestorbene Neuronen. Es gibt verschiedene Typen von Astrocyten, zum Beispiel protoplasmatische und Nervenfaserbegleitende. Ihre Stern-förmigen Fortsätze umhüllen die Synapsen der Nervenzellen.

Astrocyten ernähren Neuronen, indem sie Glukose von den Kapillaren aufnehmen, es zu Laktat abbauen und in die extrazelluläre Umgebung abgeben. Von dort wird es durch die Neuronen aufgenommen und in ihren Mitochondrien in Energie umgewandelt. Astrocyten speichern kleinere Mengen Glykogen. Sie dienen als Reserve für den Fall, dass der Stoffwechsel der lokalen Neuronen besonders hoch ist. Astrocyten produzieren viele Proteine, die für das Überleben, die Wanderung, Differenzierung und Funktion der benachbarten Neurone wichtig sind. Diese Rolle ist

<sup>6</sup>aktive Nervenzellen geben Kaliumionen ab, die von den Astrocyten aufgenommen werden. Sonst würden sie die Nervenzellen depolarisieren (Epilepsie!)



Abbildung 7.8: Astrocyten in Nähe einer Blutkapillare des Gehirns, mit sternförmigen Ausläufern, osmiert. Bild eines Präparates von Dr. Klaus Reutter

besonders offensichtlich während der Entwicklung, bleibt aber im normalen adulten Gehirn erhalten und wird bei Verletzungen wieder verstärkt. Die beteiligten Moleküle sind unter anderem Cytokine, Chemokine und trophische Faktoren. Sie können als trophische oder toxische Substanzen wirken und werden je nach dem Entwicklungszustand und der Reife des Gehirns unterschiedlich durch die Signale freigesetzt, die auf die Astrocyten einwirken. Außerdem unterscheiden sich die von den Astrocyten abgegebenen Moleküle je nach dem Ort, sodass sie spezifisch mit den benachbarten Neuronen interagieren können (Jean et al. (2008)).

Astrocyten können demnach mit den Neuronen kommunizieren. Nimmt zum Beispiel die Ca-Konzentration in den Astrocyten zu, geben sie Glutamat ab. Dadurch sinkt bei den meisten Neuronen die Signalaktivität. Auch die Neuronen können über Glutamat mit den Astrocyten kommunizieren. Durch das Glutamat produzieren Astrocyten trophische Faktoren und geben diese ab. Dadurch können Neuronen leichter Informationen für

das Gedächtnis verarbeiten. Bei Alzheimer Erkrankung könnte das eine Rolle spielen. Auch andere Gehirnerkrankungen könnten mit der Glutamat-Abgabe durch Astrocyten zu tun haben. So wird vermutet, dass durch den HIV-Virus oder durch Sauerstoffmangel bei Hirnschlag zu viel Glutamat abgegeben wird und die Neuronen deshalb absterben. Könnte man die Astrocyten durch Medikamente dazu bringen, das Glutamat aufzunehmen, würden die Neuronen nicht absterben.

Auch im SCN gibt es Astrocyten, wie bei Mäusen durch Immunreaktion mit einem spezifischen Marker (glial fibrillary acidic protein GFAP) gezeigt wurde. Der Nachweis ist während der Tagphase am deutlichsten. Die Astrocyten exprimieren Cytokine und reagieren auf sie. Sie übermitteln Signale vom Immunsystem zum SCN (Peters (2005)). In diesen Astrocyten werden bei Maus- und Ratten-Kulturen Per1 und Per2 circadian exprimiert, wie Versuche von Prolo et al. (2005) mit Per2::luc knock-in Mäusen<sup>7</sup> und Per1::luc transgenen Ratten zeigen. Die in Echtzeit gemessene Biolumineszenz der Genaktivität schwankt mit einer genetisch festgelegten Periode. Der Rhythmus dämpft

nach einigen Tagen aus, kann aber wieder neu angestoßen werden, wenn das Medium ausgetauscht wird. Medienwechsel vor völligem Ausdämpfen verschiebt den Rhythmus Phasen-abhängig. Der Rhythmus lässt sich durch tägliche Temperaturzyklen mit 1.5°C Unterschied synchronisieren. Er verläuft wesentlich länger, wenn die Zellen mit Explantaten des adulten SCN kokultiviert werden. Corticale Explantate sind dagegen nicht in der Lage, die Dämpfung aufzuheben. Nach Scemes and Giaume (2006) können offenbar verschiedene Signale einschließlich eines diffundierbaren Faktors vom SCN die circadiane Schwingung in den Astrocyten vom SCN aufrecht erhalten.

Unter den verschiedenen Arten der Kommunikation zwischen Gliazellen und Neuronen spielen synaptische Interaktionen der Astrocyten eine besondere Rolle. Strukturelle und physiologische Untersuchungen zeigen periphere Astrocytenfortsätze in der Nähe des synaptischen Spalts. Sie enthalten das Aktin-bindende ERM-Protein Ezrin, wodurch sich die Fortsätze rasch ändern können. Ihre Bedeutung zeigt sich im SCN, wo sich die Gestalt der Astrocyten je nach der Aktivität des Tieres ändert (Derouiche et al. (2002)) und damit die circadiane Zeit widerspiegelt.

Verschiedene Hirnareale des adulten Nervensystems können ihre Struktur je nach Erfahrungen ändern. Diese morphologische Plastizität betrifft nicht nur Neuronen, sondern auch Gliazellen (obwohl diese ihren Ort wechseln können). Sie ist unter bestimmten physiologischen Bedingungen wie Reproduktion, sensorische Reizung und Lernen zu beobachten und betrifft vor allem die distalen Fortsätze, mit denen die Neuronen umgeben werden. Die Änderungen geschehen in we-

<sup>7</sup>Knock-in Mäuse sind genetisch verändert, indem eine Protein-kodierende cDNA-Sequenz an einem bestimmten Ort eines Chromosoms eingebaut ist. Damit kann die Funktion der regulatorischen Maschinerie (zum Beispiel von Promotoren) herausbekommen werden, die zur Expression des natürlichen Gens führt: Man beobachtet dann den neuen Phänotyp des Organismus.

Im Gegensatz dazu wird bei knock-out Mäusen (Abkürzung KO) das Gen funktionslos gemacht. Mit dieser Methode kann ein Gen, das sequenziert ist, aber dessen Funktion nicht oder nur teilweise bekannt ist, besser verstanden werden, indem man die Unterschiede zwischen den knockout Organismen und den normalen beobachtet.

nigen Minuten. Die Geometrie und Diffusionseigenschaften des extrazellulären Raumes und die Beziehung zu den benachbarten neuronalen Elementen, besonders den Synapsen, wird dadurch beeinflusst. Da Astrocyten auf neuronale Aktivität mit Ionenkanälen, Neurotransmitterrezeptoren und Transportern in ihren Fortsätzen reagieren, werden Informationen über neuroaktive Substanzen vermittelt. Damit werden diese Interaktionen zwischen Astrocyten und Neuronen hochdynamisch. Sie modifizieren die extrazelluläre Homöostase der Ionen, die Neurotransmission, Glia-Transmission und letztendlich die neuronale Funktion auf der zellulären und systemischen Ebene ([Theodosis et al. \(2008\)](#)).

Auch Melatonin beeinflusst die interzelluläre Kommunikation zwischen Gliazellen ([Peters et al. \(2005\)](#)). Dabei unterscheidet sich die Reaktion der Astrocyten auf Melatonin in den verschiedenen Hirnregionen, was auf einer unterschiedlichen Reaktion der Melatoninrezeptoren zu beruhen scheint.

Astroglia scheint auch bei Depressionen eine Rolle zu spielen ([Theodosis et al. \(2008\)](#)). Es gibt einen Zusammenhang zwischen Diabetes und Depressionen. In beiden Fällen ist der Glukose-Stoffwechsel im Gehirn geändert. Im Gehirn haben aber nur Astrogliazellen Insulinrezeptoren.

### 7.3 Augenuhren

Circadiane Uhren sind eine der faszinierendsten Anpassungen der Lebewesen an die Umwelt. Die Organismen können damit nicht nur den Tag-Nacht-Wechsel voraussehen, sondern sie auch benutzen, um die Tageslänge zu messen und damit die Jahreszeit zu bestimmen. Da die Perioden-

länge nicht genau 24 Stunden lang ist, muss die Uhr jeden Tag durch Umweltsignale (Licht, Temperatur) in ihrem Gang korrigiert werden. Die bei der Synchronisation durch Licht beteiligten Photorezeptoren sind allerdings in vielen Fällen selbst unter circadianer Kontrolle (ihre Transkription, Rückkopplung der Uhr auf die Lichteingänge, siehe [Devlin \(2002\)](#)).

Um die Jahreszeit zu bestimmen, werden bei den Säugern die photoperiodischen Signale der Umwelt zum Pinealorgan übertragen, wo sie als Melatoninsekretion dekodiert werden. Arbeiten an Mausmutanten lassen vermuten, dass dabei zwei verschiedene molekulare Oszillatoren jeweils den Lichtbeginn oder das Lichtende registrieren und daraus die Tageslänge ermitteln und dem Organismus mitteilen ([Oster et al. \(2002\)](#)).

Bei Meeresschnecken wie *Bulla gouldiana*, die in wärmeren Meeren auf sandigem Boden lebt, gibt es circadiane Uhren in besonderen Zellen der Augen, den basalen Neuronen. Sie steuern das Feuern der Nervenzellen ([Block et al. \(1995\)](#), [Page \(2001\)](#)). Dadurch kommt es in den Augennerven zu einem rhythmischen Aktionspotential ([Jacklet \(1969\)](#)). Die Augen (Abbildung 7.9) lassen sich isolieren und für längere Zeit in einem geeigneten Medium halten. In Abbildung 7.10) ist die Frequenz und Amplitude der elektrischen Impulse aufgetragen. Nach [Michel et al. \(1993\)](#) zeigen auch isolierte basale Neuronen über mindestens zwei Tage hinweg circadiane Rhythmen.

Der circadiane Rhythmus der Augen wird durch Licht synchronisiert, aber auch vom Gehirn. Serotonin dient dabei als Neurotransmitter. Seine Interaktion mit Licht ist komplex ([Colwell \(1990\)](#)).

Circadiane Uhren haben sich möglicherweise zusammen mit Licht-

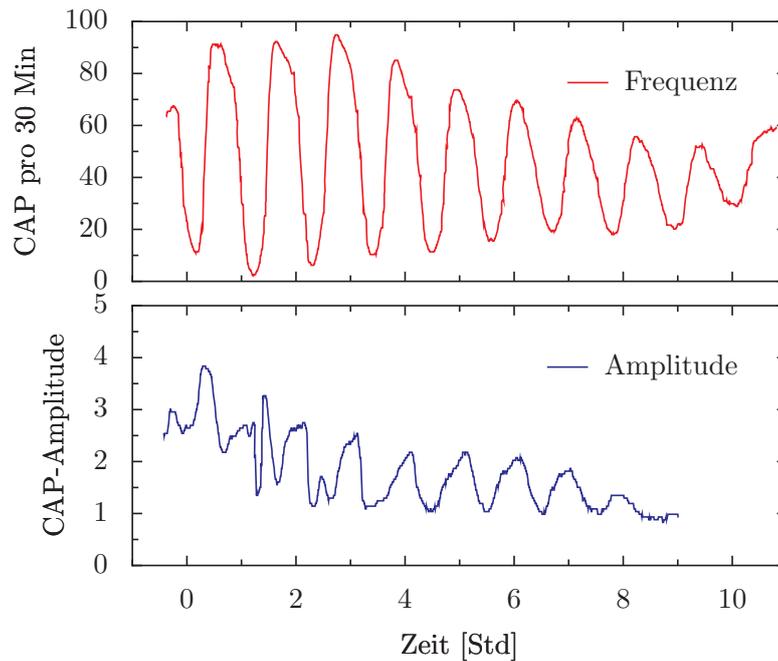


Abbildung 7.10: Circadianer Rhythmus der CAP Amplitude (oben, blaue Kurve) und Frequenz (unten, rote Kurve) isolierter Augen im Dunkeln. Nach [Benson and Jacklet \(1977\)](#)

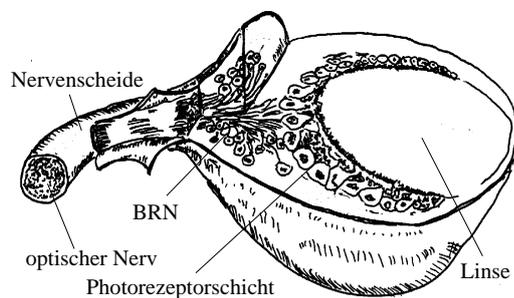


Abbildung 7.9: Auge von *Bulla gouldiana*. Von rechts nach links: Linse, Photorezeptorschicht, basale retinale Neuronen (BRN) an der Basis des Auges dreidimensional dargestellt, optischer Nerv mit Nervenscheide teilweise aufgeschnitten. Nach [Roberts and Moore \(1987\)](#)

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. Solche Entwicklungen mögen mehrfach stattgefunden haben mit verschiedenen Photopigmenten als Ausgang und

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

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 Phylogenie entstanden (Land and Fernald (1992)). 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.

Auch in der Retina der Säuger gibt es circadiane Oszillatoren. Sie waren die ersten außerhalb des SCN entdeckten circadianen Oszillatoren bei Säugern (Tosini et al. (2008)). Morphologische, neurochemische, elektrophysiologische und optische Untersuchungen deuten auf solche Uhren hin (Remè et al. (1991)). Diese circadianen Uhren gibt es nicht nur in der inneren Körner- und Ganglienschicht (Ruan et al. (2006)), sondern auch in der Photorezeptorschicht (Tosini et al. (2007)). Sie oder wahrscheinlich eher ein Netzwerk hierarchisch organisierter circadianer Uhren in der Retina kontrollieren dort viele der physiologischen, zellulären und molekularen Rhythmen (Morin and Allen (2006), Brainard and Hanifin (2005), Doyle and Menaker (2007)). Verschiedene (zumindest zwei) Oszillatoren scheinen in der Retina vorhanden zu sein. So wird dort Melatonin und Dopamin in den Photorezeptoren und der inneren Retina antiphasisch reguliert (Green and Besharse (2004)). Melatonin wird sehr wahrscheinlich in den Zapfen synthetisiert. Ähnlich wie im Pinealorgan ist die Synthese in der Nacht stark und am Tage gering. Das retinale Melatonin scheint nur lokal als Neurohormon und/oder als Neuromodulator zu wirken. Die Melatoninsynthese erfolgt circadian und ist in vivo und in vitro nachgewiesen worden. Der

Rhythmus wird durch Licht synchronisiert und ist Temperatur-kompensiert (Tosini and Fukuhara (2003)). Während bei anderen Wirbeltieren neben den Augen auch extraretinale Photorezeptoren beteiligt sind, um die Zellen des SCN auf den Licht/Dunkel-Wechsel des Tages zu synchronisieren, wird dazu bei den Säugern nur die Retina der Augen benutzt (Abbildung 7.11). Warum andere Wirbeltiere neben der Retina auch Photorezeptoren tief im Gehirn (Pinealorgan) benutzen, könnte eine besondere Rolle bei der Synchronisation spielen. Außerdem steuern sie direkte Reaktionen auf Licht, die Pupillenreaktion und photoperiodische Ereignisse (Doyle and Menaker (2007)).

Die Stäbchen und Zäpfchen sind bekanntlich für das Gestalt sehen verantwortlich. Aber eine Population retinaler Ganglienzellen nimmt wahr, ob in der Umwelt Licht oder Dunkelheit herrscht (Helligkeitsdetektoren). Diese bipolaren Zellen (Landolts Keulen) verwenden als Lichtpigment Melanopsin<sup>8</sup>. Sie befinden sich in der äußeren Nuklearschicht der Retina und enden zwischen dem pigmentierten Epithel und den inneren und äußeren Segmenten der Stäbchen und Zäpfchen (Locket (1999), van Reeth et al. (1997), Abbildung 7.12). Sie sind über die gesamte Retina verteilt und projizieren über einen besonderen Weg, den retinohypotalamischen Trakt (RHT)<sup>9</sup>, zum SCN (aber nicht zu den Sehzentren des Gehirns, Referenzen in Provencio et al. (1998), Abbildung

<sup>8</sup>wird das Melanopsin-Gene funktionslos gemacht, kann Licht nicht mehr die circadiane Uhr synchronisieren und der Pupillenreflex fällt aus (Brown and Robinson (2004))

<sup>9</sup>die Neurotransmitter PACAP und Glutamat übermitteln die Signale des Licht-Dunkel-Wechsels über den RHT zum SCN (Hannibal (2006))

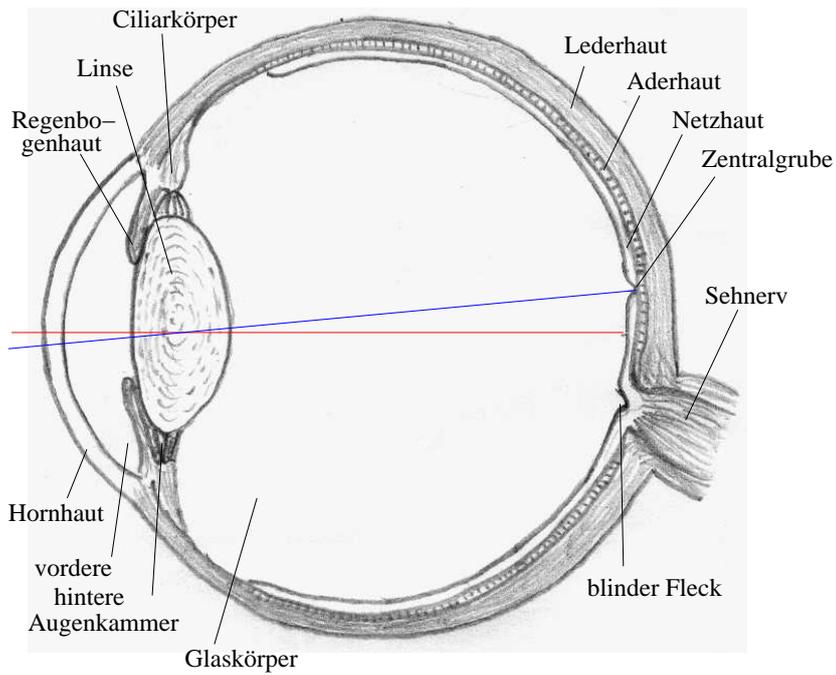


Abbildung 7.11: Auge eines Wirbeltieres (Longitudinalschnitt) mit Hornhaut, vorderer Augenkammer, Regenbogenhaut, Linse, Ciliarkörper, Glaskörper, Netzhaut, Aderhaut, Lederhaut, Zentralgrube, blindem Fleck und Sehnerv. Augenachse (rot) und Sehlinie (blau) sind eingezeichnet. Pigmentzellen. Vom Autor gezeichnet nach einer Abbildung in *Mörke and Mergenthaler (1959)*

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

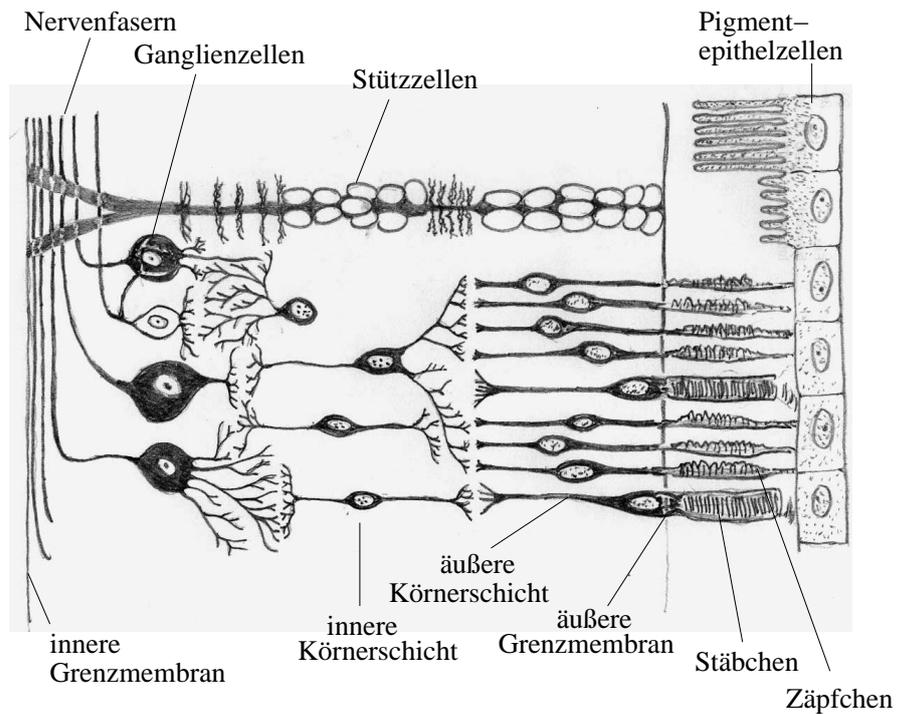


Abbildung 7.12: Teil der Netzhaut mit innerer Grenzmembran, Ganglienzellen mit Nervenfasern, innere Körnerschicht mit bipolaren und sonstigen Nervenzellen, Stützzellen, äußere Körnerschicht mit Zellkernen der Stäbchen und Zäpfchen, äußere Grenzmembran, Stäbchen und Zäpfchen, Pigmentepithel und Pigmentzellen. Glaskörper und Linse würden links liegen, von dort kommt also das Licht. Vom Autor gezeichnet nach einer Abbildung in [Mörke and Merghaler \(1959\)](#)

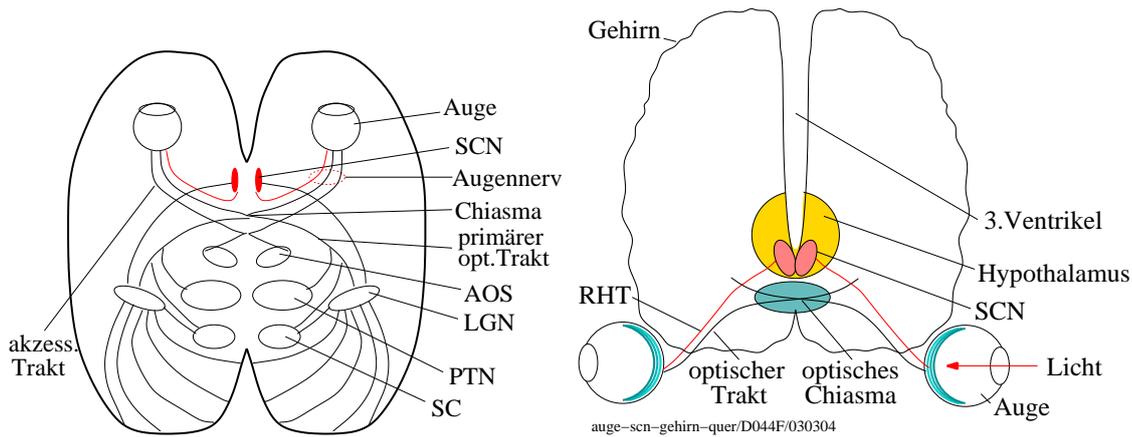


Abbildung 7.13: Visuelle Wege von den Augen zum Gehirn beim Hamster. Links: Gehirn von oben. Rechts: Querschnitt durchs Gehirn in der Gegend des Hypothalamus und SCN. Licht wird über die Retina der Augen wahrgenommen und über den primären optischen Trakt, das akzessorische optische System (nicht gezeigt) und den retinohypothalamischen Trakt (RHT) zum visuellen Cortex im Gehirn weitergeleitet. Der RHT endet im suprachiasmatischen Kern (SCN). Dieser enthält zahlreiche 'Schrittmacher'-Zellen für die circadiane Rhythmik. Nach Moore-Ede et al. (1982)

7.13). Glutamat dient dabei als Neurotransmitter und synchronisiert die Schrittmacher im SCN (siehe Abbildung 7.6). Sie sind miteinander entweder als addierende oder als mittelnde Prozessoren verbunden (Foster et al. (1993)). Neben der Synchronisation auf den Licht-Dunkel-Wechsel kontrollieren diese Ganglienzellen auch den Pupillenreflex und modulieren neuroendokrine Funktionen. Als Farbstoff wird von ihnen Melanopsin verwendet (Nayak et al. (2007)).

Obwohl Säuger während der Geburt funktionell blind sind, weil sie auf die Photorezeptoren der Stäbchen und Zapfen noch nicht reagieren, können sie über die retinalen Ganglienzellen Licht erkennen, weil diese dann bereits funktionell mit dem SCN verbunden sind (Sernagor (2005)).

## 7.4 Pinealorgan und Melatonin

Der SCN der Säuger projiziert zum Pinealorgan und synchronisiert dessen Melatonin-Produktion und -sekretion mit dem Licht/Dunkel-Wechsel des Tages (niedrige Konzentration am Tage, hohe in der Nacht). Die Reproduktion verschiedener Säuger wird durch die Tageslänge kontrolliert (Baker and Ranson (1932), Bissonette (1932)), und Melatonin dient dabei als Indikator der Länge der Dunkelperiode. Neben dem reproduktiven System werden beim Djungarischen Hamster auch Körpergewicht, Fellfarbe (Hoffmann (1973), Figala et al. (1973)) und die Körpertemperatur photoperiodisch geregelt (Steinlechner and Heldmaier (1989)). Somit übermitteln das Pinealorgan und sein Hormon Melatonin die photoperiodischen Signale der Umwelt auf die neu-

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

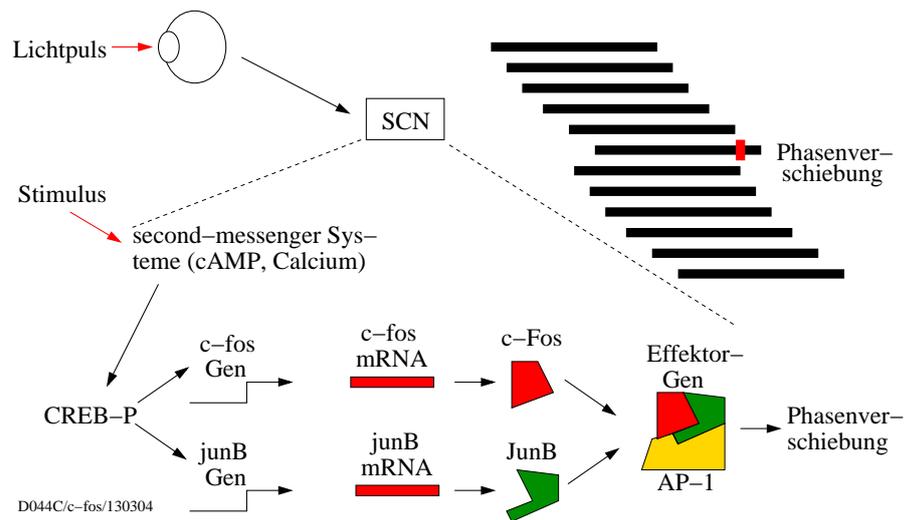


Abbildung 7.14: Oben: Lichtpulse werden über die Retina der Augen perzipiert und als Signal ans SCN weitergeleitet. Dort verschiebt es die Phase der circadianen Oszillatoren und als Folge davon den lokomotorischen Aktivitätsrhythmus (schwarze horizontale Balken für jeden Tag, rote Markierung: Lage des Lichtpulses, der den Rhythmus nach vorn verschiebt). Darunter: Signalübertragungs-Kaskade zur Synchronisation von Hamstern durch Licht-Dunkel-Zyklen. Ein äußerer Reiz (ein Neurotransmitter oder ein Hormon) aktiviert ein second messenger System (cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$ ). 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 \(1995\)](#)

## 7.4 Pinealorgan und Melatonin

roendokrine Achse. Diese Signale können stimulierend oder hemmend sein (Hoffmann (1981)). Melatonin wirkt aber auch auf den SCN zurück. Hier hemmt es die neuronale Aktivität und verschiebt die Phase des circadianen Rhythmus (Abbildung 7.15).

Obwohl bei Säugern die Entfernung des Pinealorgans im Dauerdunkel das circadiane System wenig beeinträchtigt, haben neue Untersuchungen gezeigt, dass dieses Organ doch wichtig ist. So wird bei Ratten durch Pinealektomie (PINX) die Rhythmus-dämpfende Wirkung von Dauerlicht verstärkt. Das könnte daran liegen, dass diese Tiere das Licht so wahrnehmen, als hätte es eine höhere Intensität (bei der die dämpfende Wirkung bei Kontrolltieren stärker ist). Oder das Pinealorgan ist über seine Melatonin-Sekretion an der Kopplung von Komponenten des circadianen Systems beteiligt. Diese Kopplung kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden, (1) zwischen afferenten Nerven des retinohypothalamischen Trakts und den Oszillator-Neuronen des suprachiasmatischen Kerns (SCN), (2) zwischen den SCN-Ozillatoren, (3) zwischen dem SCN und seinen verschiedenen Ausgängen und/oder (4) zwischen den verschiedenen circadianen Ausgängen. Warren and Cassone (1995) zeigen, dass PINX-Ratten bei vier verschiedenen Lichtintensitäten immer längere Perioden haben als die SHAM-operierten Ratten. Außerdem ist der Unterschied der Periodenlängen bei den PINX-Ratten größer. Das spricht für Hypothese (1). Nicht nur der Laufrad-Rhythmus wird im Dauerlicht bei PINX-Tieren stärker gedämpft, sondern auch der Rhythmus der allgemeinen Aktivität, der Körpertemperatur und der Herzrate, und all diese Rhythmen sind gleichermaßen beeinflusst. Das spricht für die Hypothese (2). Hypothese (3) trifft nicht zu, da Entfernung der Augen keinen Effekt auf die Bindung von 2-

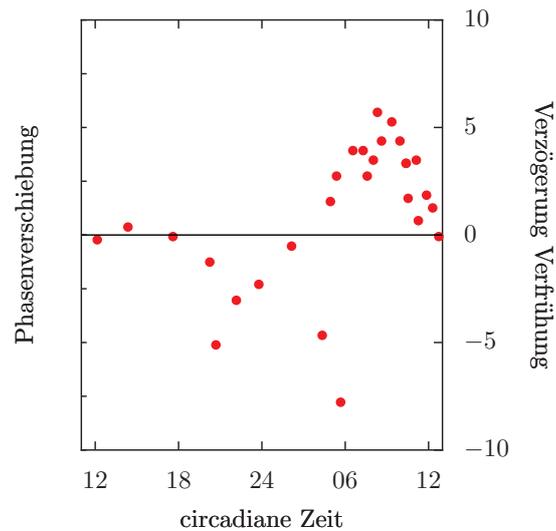


Abbildung 7.15: Ob ein Melatoninpuls den circadianen Rhythmus beim Menschen verfrüht oder verspätet und wie stark diese Verschiebung ist, hängt von dem Zeitpunkt (x-Achse, in circadianer Zeit) ab, zu dem der Puls gegeben wird. Der Rhythmus ist zwischen CT 12 bis 18 nur wenig beeinflusst, verzögert zwischen CT 12 bis 18 und verfrüht zwischen CT 20 bis 03 Nach Lewy et al. (1992)

Jod-Melatonin im SCN hat.<sup>10</sup>

Im Gegensatz zu den Säugern, bei denen die Zellen des Pinealorgans keine selbständigen Oszillatoren sind, sondern über den SCN getrieben werden, sind die Pinealocyten der anderen Vertebraten (Vögel, Reptilien, Amphibien, Fische) mit circadianen Uhren und mit Photorezeptoren ausgestattet. Sie können somit auch ohne Retina mit dem Licht/Dunkel-Wechsel synchronisiert werden (Kumar et al. (1993)). Bei diesen Vertebraten ist das Gehirn ziemlich Licht-durchlässig. Photorezeptoren im Gehirn können somit die

<sup>10</sup>Ein Melatonin-Agonist verschiebt nach van Reeth et al. (1997) den circadianen Rhythmus von Mäusen (und Goldhamstern) phasenabhängig

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

Lichtverhältnisse der Umwelt wahrnehmen.

Die Pineale der Nicht-Säuger-Vertebraten und ihre Uhren, ihre Funktion und Lichtempfindlichkeit sowie die Signale der Ausgänge sind von [Falcon \(1999\)](#) zusammengefasst. [Klein \(2006\)](#) hat die Beziehungen zwischen Pinealocyten und retinalen Photorezeptoren zusammengestellt und vorgeschlagen, wie das Pineal und der Melatoninrhythmus sich entwickelten. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Arylalkylamin N-Acetyltransferase (AANAT). Die Melatoninproduktion ist immer in der Nacht erhöht. Alle Vertebraten können dieses Signal benutzen, aber in unterschiedlicher Weise. Melatonin hat nämlich nicht nur eine bestimmte biologische Wirkung: Melatonin fördert Schlaf bei einigen Tieren, aber nicht bei allen, es hemmt die Reproduktion und erhöht das Körpergewicht, aber nicht bei allen, es stimuliert die lokomotorische Aktivität, aber nicht bei allen. Melatonin ist also ein Zeit-Anzeiger, der von verschiedenen Tierarten unterschiedlich und zu ihrem jeweils größten Vorteil benutzt wird.

Die circadiane Steuerung der Melatoninproduktion macht die Vertebraten unabhängig vom Licht/Dunkel-Wechsel der Umwelt, was zum Beispiel bei Nagern wichtig ist, die tagsüber in ihrem unterirdischen Bau verbringen. Sie können durch diese innere Uhr voraussagen, wann der Tag beginnt oder endet und ob es Tag oder Nacht ist. Physiologische Ereignisse können so zur richtigen Zeit in Gang gesetzt werden. Durch den LD-Wechsel wird der Melatoninrhythmus synchronisiert, wodurch auch die jahreszeitliche Änderung der Tageslänge reflektiert wird.

Dem Melatoninrhythmus-generierenden System aller Tiere ist gemeinsam, dass zyklisches AMP in der

Proteinkinase A zwei stark konservierte Motive am N- und C-Ende beeinflusst ([Ganguly et al. \(2005\)](#)). Dadurch wird AANAT stabilisiert und die Melatoninproduktion erhöht. Licht destabilisiert AANAT und es wird abgebaut.

Daneben gibt es Klassen- und Art-spezifische Unterschiede im Pineal ([Ekström \(2003\)](#), [Collin and Oksche \(1981\)](#), [Klein et al. \(1998\)](#)). Bei den Nicht-Säugetieren einschließlich Fischen und Vögeln sind Uhr, Photorezeptoren und Melatonsynthese in den Pinealocyten lokalisiert ([Cassone \(1991\)](#), [Falcon et al. \(2003\)](#), [Iuvone et al. \(2005\)](#)), während sich bei den Säugern die Uhr im SCN befindet ([Moore-Ede et al. \(1982\)](#), [Klein and Krieger \(1979\)](#), [Klein \(1985\)](#)). Bei den Vögeln wirkt Licht sowohl über Pinealocyten als auch über die Retina und einem Homolog des SCN ([Cassone \(1991\)](#)).

Viele Eigenschaften haben Pinealocyten und retinale Photorezeptoren gemeinsam. Die Pineale der Fische und Amphibien können Licht wahrnehmen; das gilt auch für Pinealocyten-Kulturen der Vögel und Fische. Wie das Pineal kann auch die Retina Melatonin produzieren ([Iuvone et al. \(2005\)](#)). Melatonin soll die Lichtadaptation der Retina erleichtern. Es gibt ferner anatomische Ähnlichkeiten zwischen Pinealocyten und Photorezeptoren ([Klein \(2004\)](#)). Genetische Hinweise deuten in die gleiche Richtung. Die Entwicklung der Pinealocyten und der retinalen Photorezeptoren erfolgt in ähnlicher Weise. Beide stammen ursprünglich von einer lichtempfindlichen Melatonin synthetisierenden Zelle ab (Abbildung 7.16). Sie haben sich dann im Laufe der Evolution in zwei verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen entwickelt ([Klein \(2006\)](#), [Yoshikawa and Oishi \(1998\)](#)). Bei Reptilien (*Iguana*) ist das Pineal für die cir-

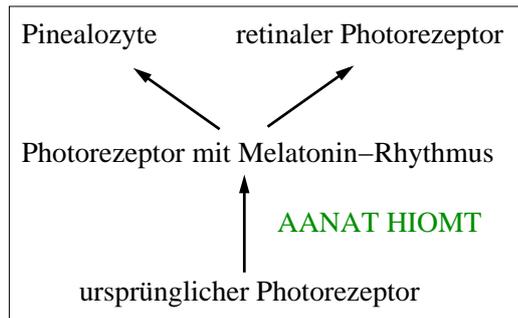


Abbildung 7.16: *Abstammung der Pinealocyten und retinalen Photorezeptoren von einem ursprünglichen Photorezeptor*

cadiane Kontrolle der Körpertemperatur, aber kaum für die lokomotorische Aktivität verantwortlich.

## 7.5 Fibroblasten

Fibroblasten bilden die Interzellulärsubstanz des Bindegewebes. Sie werden danach zu Fibrocyten (Spindelzellen, Bindegewebszellen). Sie lassen sich aus ausgestanzten Hautstücken (2mm Durchmesser) züchten. Bei verschiedenen Geweben von Mäusen wurde das luc-Gen mit einem circadianen Promoter mit Hilfe eines Reporter-Virus fusioniert (Brown et al. (2005), Welsh et al. (2004), Yamazaki et al. (1998)), sodaß das Licht als Zeiger der circadianen Uhr benutzt werden konnte. Es wurden einzelne Fibroblasten für ein bis zwei Wochen gemessen und ein robuster, ungedämpfter circadianer Rhythmus gefunden. Die einzelnen Zellen zeigen unterschiedliche Periodenlängen. Deshalb kommen die verschiedenen Zellen nach einigen Tagen außer Takt, auch wenn sie anfangs durch einen Medium-Wechsel miteinander synchronisiert waren. Die Zellen sind also in der Kultur nicht miteinander gekoppelt (Welsh et al. (2004)).

Die Synchronisation wird im Säuger durch diffusible Signale des SCN bewirkt (Allen et al. (2001))<sup>11</sup>. Co-kultiviert man Fibroblasten mit diesen Zellen, werden sie über diffusible Signale synchronisiert, aber mit einem Phasenwinkel von 12 Stunden in Bezug auf den Rhythmus des SCN. Auch mit einem Serum-Schock lässt sich die Genexpression von Uhr-Genen synchronisieren, wobei das Maximum der mRNA von Per1 und Per2 dem der Cry1 und Cry2 um vier Stunden vorseilt. Die Stoffwechselaktivität wird durch diese Behandlung nicht synchronisiert. Dazu sind SCN-spezifische Ausgänge nötig, die nicht direkte Produkte der Uhr-Gene sind (Allen et al. (2001)).

In den Geweben schwankte die intraindividuelle Periodenlänge weniger als die interindividuelle (zwischen 23 und 26 Stunden). Brown et al. (2005) untersuchte die Fibroblasten von 19 Spendern, deren mittlere Periodenlänge 24,5 Stunden ( $\pm 45$  Minuten Standardabweichung) betrug. Die Periode entsprach im Schnitt derjenigen, die durch physiologische Untersuchungen unter Zeitgeber-freien Bedingungen erzielt wurde, die Schwankungen waren aber größer<sup>12</sup>. Die Standardabweichungen der Perioden von Proben verschiedener Personen betrug 48 Minuten. Das heißt also, dass es signifikante Unterschiede der Fibroblasten-Uhren sogar in kleinen Populationen gibt. Biopsien von Uhr-Mutanten von Mäusen erga-

<sup>11</sup>Nur SCN2.2-Zellen zeigen einen circadianen Rhythmus der 2-Deoxyglucose-Aufnahme und der Per-Expression

<sup>12</sup>Verschiedene Messungen an der gleichen Probe ergab Standardabweichungen von 18 Minuten, an Proben, die durch eine andere Virusinfektion erhalten wurden, 25 Minuten und Durchschnittswerte verschiedener Biopsien von der gleichen Person hatten eine Standardabweichungen von 6 Minuten

ben Perioden, die denen entsprachen, die über das Verhalten ermittelt waren oder im Fall von arrhythmischen Mutanten keine Rhythmen zeigten. In den meisten Fällen waren aber die Perioden der Fibroblasten variabler als die über das Verhalten bestimmten.

Nomura et al. (2008) fand an Fibroblasten von endogen-depressiven Patienten eine verkürzte Periodenlänge. Auch das SCN hat eine kurze Periode, wie Messungen SCN-gesteuerter Vorgänge zeigten. Antidepressiva wie SSRI (*selective serotonin reuptake inhibitor*), Sertralin, Fluoxetine, Fluoxamin, Citalopram und Paraxetin verkürzten die Periode. Sertralin verringerte die Amplitude und erniedrigte die Dämpfungsrates der Fibroblasten Dosisabhängig.

Weitere Literatur: Nagoshi et al. (2004), Yagita (2004), Yagita et al. (2001).

### 7.6 Intrakardiale Uhr, Cardiomyocyten, Monocyten

Herz und Kreislauf werden im Laufe des Tages einer Fülle von äußeren Reizen ausgesetzt, die alle die myokardiale Kontraktion beeinflussen (Bray and Young (2008)). Am stärksten wirken der Schlaf-Wach-Zyklus und der F/NF(food/non-food)-Zyklus. Wachperioden sind mit erhöhter physischer Aktivität, höherer Herzrate und Herzleistung und bei reichlichem Nahrungsangebot mit erhöhter Nahrungsaufnahme verbunden. Fehlt das Nahrungsangebot, kann die Schlafphase um mehrere Tage oder gar Wochen verlängert werden. Dann werden auch für das Herz verschiedene Strategien eingeschlagen.

Der myokardiale Stoffwechsel schwankt tagesperiodisch. Es handelt sich dabei um ein komplexes Zusammenspiel extrazellu-

lärer (neurohumoraler) und intrazellulärer Faktoren (circadiane Uhr). Eine intramyokardiale circadiane Uhr steuert den Stoffwechsel sowohl direkt (z.B. Triglycerid- und Glykogen-Stoffwechsel) als auch indirekt (Modulation der Reaktion des Myokardiums auf Belastung, Insulin, Fettsäuren). Auf diese Weise können Umweltreize (Belastungsänderungen, Ernährungszustand) frühzeitig erkannt werden. Diese Synchronisation zwischen dem Myokardium und der Umwelt wird durch regelmäßige Nahrungsaufnahme gefördert. Wenn das Herz seinen Stoffwechsel nicht adäquat anpasst, kann es zur Dysfunktion der Kontraktionen kommen. So können durch Bluthochdruck, Diabetes, Schichtarbeit, Apnoe und Fettleibigkeit bedingte Krankheiten auch durch Störungen im circadianen System entstehen (siehe Young (2006), Durgan and Young (2008) und Kapitel 8). Es gibt Schwankungen im oxidativen und nicht-oxidativen Glukose- und Fettsäure-Stoffwechsel im Herzen der Ratte. Dadurch wird der erhöhte Energiebedarf während der Wachphase vom Herzen vorausgesehen und es kann darauf entsprechend reagieren.

Circadiane Uhren wurden sowohl in vaskulären glatten Muskelzellen des Herzens als auch in Cardiomyocyten nachgewiesen. Cardiomyocyten adulter Ratten, die ohne Serum kultiviert wurden, zeigen stark gedämpfte circadiane Oszillationen im bmal1 und dbp (Durgan et al. (2005)). Glukose, die circadiane Uhr-Gene in Fibroblasten reaktiviert, wirkt mit und ohne Serum nicht auf Cardiomyocyten. Eine zweistündige Behandlung mit dem Neurotransmitter Norepinephrine (10  $\mu$ M) kann hingegen die rhythmische Expression der circadianen Uhr Serum-unabhängig induzieren. Circadiane Oszillationen findet man

## 7.6 Intrakardiale Uhr, Cardiomyocyten, Monocyten

auch bei den Stoffwechsel-Genen Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 4 (pdk4) und dem entkoppelnden Protein 3 (ucp3). Die circadiane Uhr läuft also auch in Myocyten des Herzens unter standardisierten Zellkultur-Bedingungen und kann den myocardialen Stoffwechsel steuern.

Nach [Fahrenbach et al. \(2007\)](#) ändert sich altersbedingt im Sinusknoten des Herzens das Verhältnis zwischen Fibroblasten und Cardiomyocyten. Möglicherweise beruhen darauf Sinusknoten-Erkrankungen. Die nicht-erregbaren Fibroblasten beeinflussen die Erregbarkeit der Schrittmacherzellen auf zwei Arten: Durch Kopplung depolarisieren sie die Cardiomyocyten und durch rein physische Trennung wird Bradycardie erzeugt, indem die elektrische Erregung verringert wird.

Circadiane Schwankungen im cardiovascularen System der Ratte wurden von [Davidson et al. \(2005\)](#) nachgewiesen, indem sie die Aktivität der gentechnisch eingefügten Luciferase durch den mPer1-Gen-Promoter in Herzgewebe-Kulturen und einer großen Zahl von Venen in vitro beobachteten. Das Gewebe zeigte 3 bis 12 circadiane Zyklen der Genexpression, bevor der Rhythmus ausdämpfte. Während die Maxima der Biolumineszenz im Herzen und allen Arterien in der späten Nacht auftraten, variierten die Phasen der Rhythmen in den Venen je nach der anatomischen Lage.

Monocyten (siehe [Abbildung 7.17](#)) sind Zellen des Immunsystems und Vorläufer der Makrophagen sowie eines Teils dendritischer Zellen. Sie zerstören körperfremde Strukturen durch Phagozytose und aktivieren die Immunabwehr. Nach ein bis drei Tagen wandern sie aus dem Blut in die Gewebe ein und leben dort als Makrophagen für mehrere Wochen bis

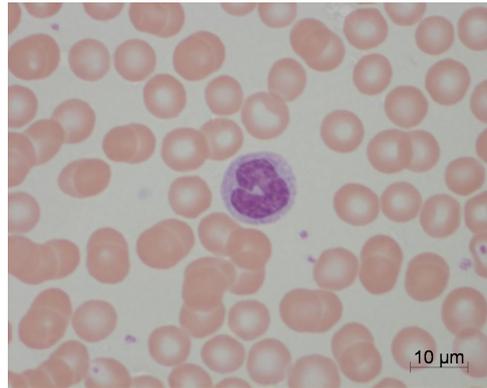


Abbildung 7.17: Eine Monozyte unter zahlreichen Erythrocyten: Zelle des Immunsystems und Vorläufer der Makrophagen. Freundlicherweise von Dr. Klaus Reutter zur Verfügung gestellt.

Monate weiter. Sie gehören mit einem Durchmesser von 5–20  $\mu\text{m}$  zu den größten der weißen Blutkörperchen (Leukocyten), besitzen einen großen Kern und wenig Zytoplasma.

[Brown et al. \(2005\)](#) infizierten 50 000 Monocyten aus dem peripheren Blut zweier Versuchspersonen ähnlich wie Fibroblasten viral mit Luciferase und bestimmten den Rhythmus durch Bildanalyse. [Abbildung 7.18](#) zeigt eine Messung. [James \(2007\)](#) untersuchten ebenfalls im peripheren Blut mononukleäre Zellen während eines typischen Schlaf-Wach-Zyklus im LD und während einer konstanten Routine. Von sechs Männern und Frauen wurde während einer fünftägigen Isolation ohne Zeitgeber die Körpertemperatur und das Plasmamelatonin als Zeiger des zentralen circadianen Schrittmachers gemessen. Die Expression der Uhr-Gene PER1, PER2 und BMAL1 wurde über 72 h hinweg bestimmt. PER1 und PER2 Expression schwankte circadian mit Maxima in der frühen Wachzeit und verlief unter

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

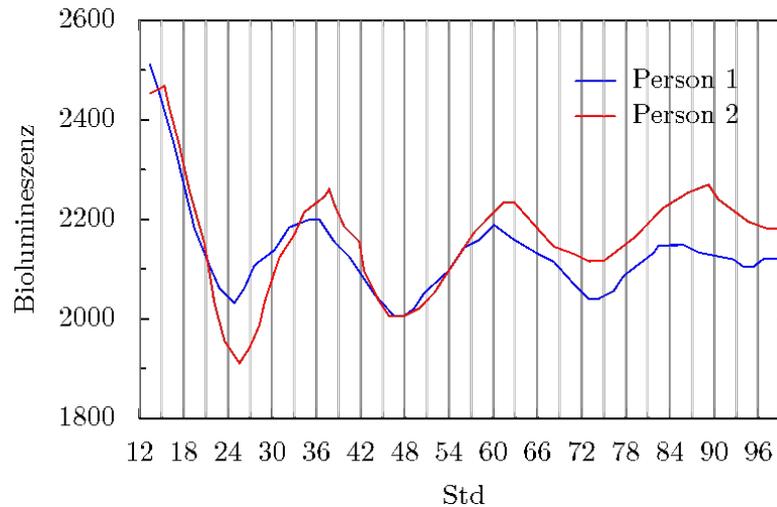


Abbildung 7.18: *Circadianer Rhythmus von Monocyten (mit künstlicher Biolumineszenz) bei zwei Personen*

Licht-Dunkel- und Konstantbedingungen gleich. Die BMAL1 Expression variierte stärker mit einem Maximum in der Mitte der Wachzeit.

### 7.7 Nierenzellen

Einen separaten circadianen Oszillator in der Niere soll es nach [Ikonov et al. \(1998\)](#) geben. Diese Autoren untersuchten, wie die Unterschiede in Tag- und Nachtaktiven Tieren zustande kommen und welche Mechanismen den Phasen und Amplituden circadianer Rhythmen zugrunde liegen. Sie verglichen die peripheren Rhythmen diurnaler und nocturnaler Säuger, und zwar Aktivitäts-unabhängige und Aktivitäts-abhängige. Die Maxima (Akrophasen) der ersten Gruppe traten bei allen Säugern zur etwa gleichen Zeit auf und dienen als interne Zeitgeber. Die Regulation der Aktivitäts-bezogenen circadianen Rhythmen des Verhaltens, des Blutdrucks und der Nierenausscheidung folgen hingegen einem anderen Mecha-

nismus. Es wird vorgeschlagen, dass ein passiver hypothalamischer Oszillator die Phasenlage circadianer Verhaltensrhythmen koordiniert und für die hohe Amplitude dieser Rhythmen verantwortlich ist. Ein separates rostrales hypothalamisches Netzwerk ist an der Regulation der niedrig-amplitudigen circadianen Blutdruck-Rhythmen beteiligt. Schließlich erzeugt ein circadianer Oszillator in der Niere den circadianen Rhythmus der Elektrolyt-Exkretion. Die Autoren schlugen ein Modell vor, nach dem die Aktivität durch die Phasenbeziehung zwischen dem circadianen und dem passiven hypothalamischen Oszillator bestimmt wird. Spezifische Hirnstrukturen oder periphere circadiane Oszillatoren integrieren circadiane und andere Signale für die verschiedenen Aktivitäts-bezogenen circadianen Rhythmen. Die gleichen hypothalamischen Gebiete modulieren außerdem selektiv circadiane Rhythmen als Reaktion auf homeostatische Reize oder Stress, ohne den circadianen Oszillator zu betei-

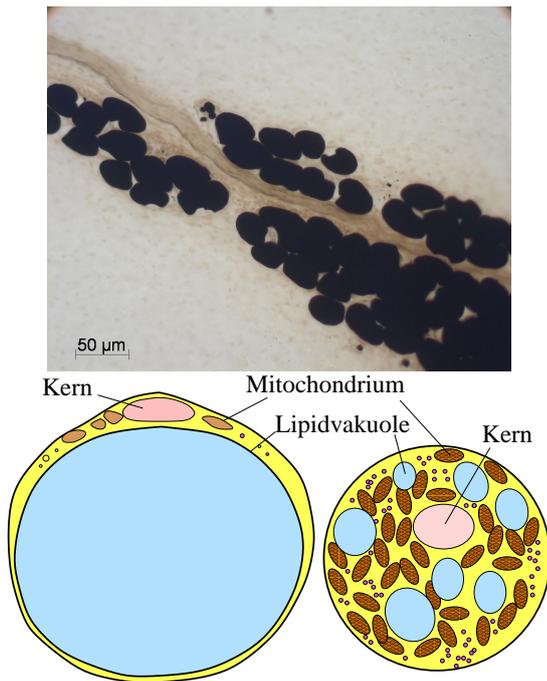


Abbildung 7.19: Oben Fettzellen (osmiert) in Nähe eines Blutgefäßes. Unten links weiße, unten rechts braune Fettzelle. Erstere hat nur eine große, letztere mehrere kleine Lipidvakuolen und zahlreiche Mitochondrien. Obere Abbildung von Dr. Klaus Reutter zur Verfügung gestellt. Untere Bilder nach einer Zeichnung von Dr. John Horwitz, U.C. Davis auf <http://sportsci.org/encyc/adipose/adipose.html>

gen.

Renale Rhythmen wurden auch von [Bray \(1965\)](#) untersucht.

## 7.8 Fettzellen

Fettgewebe ist ein lockeres Bindegewebe<sup>13</sup>, das aus Fettzellen (und anderen Zellen) besteht (siehe oberen Teil von Abbildung 7.19). Es entsteht aus Lipoblasten. In

<sup>13</sup>Seine Bildung wird durch das Adipose-Gen bewirkt

ihm wird Energie in Form von Fett gespeichert. Außerdem puffert und isoliert es den Körper. 20% des Körpergewichts beim Mann und 25% bei der Frau bestehen aus Fett. Es gibt zwei Typen von Fettgewebe, weißes und braunes (siehe unteren Teil von Abbildung 7.19). Letzteres kommt bei Babys vor (Babyspeck) und bei Winterschläfern zur Wärmeerzeugung. Im weißen Fettgewebe wird bei Bedarf Fett zu Fettsäuren umgewandelt, indem Insulin von den Langerhans'schen Inseln an Insulin-Rezeptoren des Fettgewebes andocken und über eine Phosphorylierungskaskade die Lipase aktiviert. Die Fettsäuren gelangen ins Blut, wo sie zunächst an Albumin und Glycerin gebunden sind und dann als freie Fettsäuren Brennstoff für Muskeln (zum Beispiel im Herzmuskelgewebe) abgeben (siehe Abbildung 7.20). Fettgewebe ist aber auch ein wichtiges endokrines Organ und produziert Adipocytokine<sup>14</sup>. Es sind Signalproteine (Cytokine<sup>15</sup>) zwischen Zellen (Hormone) wie Leptin, Resistin, Adipsin, Visfatin und TNF $\alpha$  (siehe Abbildung 7.21). Weißes Fettgewebe besitzt Rezeptoren für Insulin, Wachstumshormon, Norepinephrin

<sup>14</sup>Griechisch adipo-, Fett; cyto-, Zelle und -kinos, Bewegung

<sup>15</sup>zuckerhaltige Proteine, die Wachstum und Differenzierung von Körperzellen regulieren. Diese Gruppe von Peptiden startet oder reguliert die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen. Einige Cytokine werden dementsprechend als Wachstumsfaktoren bezeichnet, andere spielen eine wichtige Rolle für immunologische Reaktionen und können dann als Mediatoren bezeichnet werden. Man unterscheidet im wesentlichen fünf Hauptgruppen von Cytokinen: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. In der Zellbiologie nimmt die Bedeutung der Cytokine ständig zu. Mehrere Cytokine werden heute bereits kommerziell als rekombinante Proteine produziert.

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

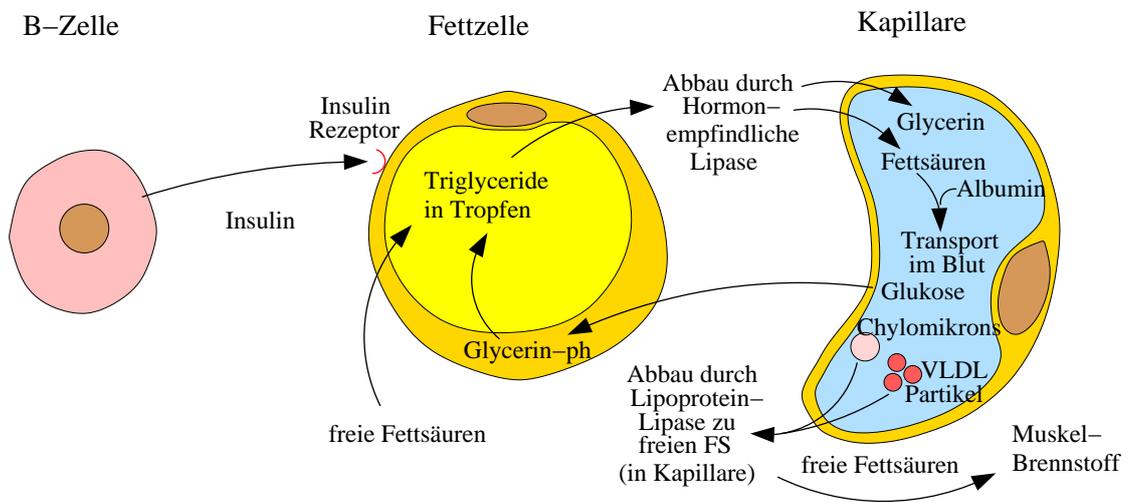


Abbildung 7.20: Fettzellen aus dem Fettgewebe geben beim Andocken von Insulin an Rezeptoren Triglyceride ab, die durch Lipase zu Fettsäuren abgebaut und im Blut zu den Bedarfsstellen transportiert werden. Näheres im Text

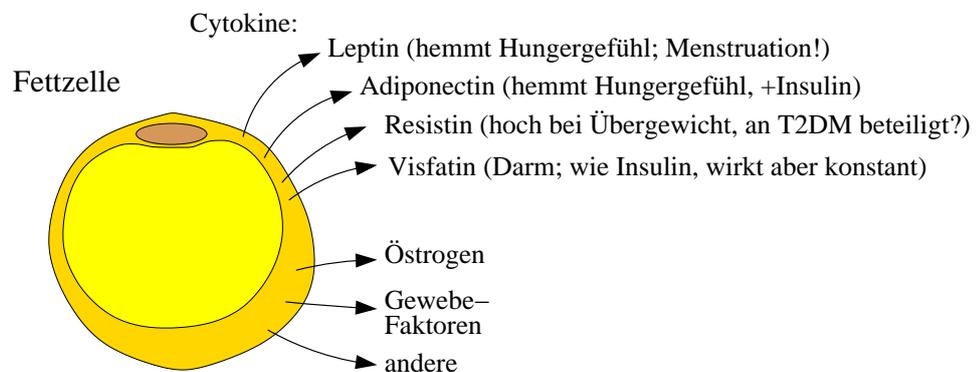


Abbildung 7.21: Fettgewebe als wichtiges endokrines Organ: Fettzellen produzieren Adipocytokine, die als Signale zwischen Zellen wirken. Näheres im Text

und Glukokortikoide.

**Leptin** (griech.: leptos = dünn) wurde 1994 durch Friedman entdeckt. Es ist ein Peptidhormon und wird durch das „obese“-Gen im Fettgewebe exprimiert. Mäuse, denen das Leptin-Gen *ob* fehlt, waren extrem fett. Die Fettleibigkeit der Mäuse konnte durch Leptingabe rückgängig gemacht werden. Ein Leptinrezeptor wurde 1995 gefunden und gehört zu der Cytokinrezeptor-Familie. Leptinrezeptoren (OB-R) gibt es im Gehirn, vor allem in afferenten Sättigungszentren des Hypothalamus, und in peripheren Organen (Fettgewebe, Skelettmuskeln, beta-Zellen des Pankreas, Leber). Es spielt bei der Energieregulation eine Rolle. Beim Menschen weist es ein ausgesprochen circadianes Sekretions-Muster auf mit Maxima um Mitternacht. Es interagiert mit Insulin und Cholecystokinin. Neben seiner physiologischen Wirkung kann es auch pathologische Folgen haben wie zum Beispiel auf Übergewicht beruhende Arteriosklerose, oxidativer Stress und Krebs (Anubhuti and Arora (2008)).

Leptin wird proportional zum Fettgehalt des Körpers von Fettzellen im Fettgewebe ins Blut abgegeben. Es gelangt über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn, wo es in Appetit-Kontrollzentren des Gehirns<sup>16</sup> den Appetit reduziert, indem es auf bestimmte Neuronen wirkt. Außerdem stimuliert es das sympathische Nervensystem, erhöht den Blutdruck, die Herzfrequenz und die Wärmeproduktion (durch Entkopplung der Zellatmung von der ATP-Synthese), senkt die Körpertemperatur und erhöht den Sauerstoffverbrauch. Dadurch wird mehr Energie abgegeben und senkt letztlich den Fettgehalt des Kör-

pers. Somit dient Leptin als ein Adipostat (Chehab (2008)). Wenn die Fettdepots des Körpers abnehmen, zirkuliert weniger Leptin im Körper und der Appetit nimmt zu. Leptin ist also ein Hormon, das vom Fettgewebe negativ auf das Gehirn rückkoppelt.

Leptin ist wichtig bei der Kontrolle von Übergewicht. Fettleibigkeit bei Mensch und Tieren beruht nicht auf zu hohem Körpergewicht, sondern auf zu viel Fett, besonders im Fettgewebe. Fettgewebe kann enorm hypertrophieren (Fettsucht), aber auch stark atrophieren (Lipodystrophie). Das liegt an den Fettzellen, die große Mengen von Triglyceriden speichern können, aber auch bei Lipidmangel zu winzigen Zellen schrumpfen. Allerdings wirkt Leptin bei starkem Übergewicht in 70% der Fälle nicht, weil der Blut-Hirn-Schranken-Transporter nicht mehr funktioniert. Er ist darauf eingestellt, schon bei niedrigen Leptin-Werten im Blutserum zu arbeiten und dem Gehirn mitzuteilen, dass genügend Fettreserven vorhanden sind, um Energie nicht nur zur Nahrungssuche, sondern auch für andere Funktionen wie Fortpflanzung, Immunsystem usw. auszugeben<sup>17</sup>. Bei Hunger und damit niedrigeren Leptin-Werten fehlt dann die negative Rückkopplung. Gleichzeitig werden vom Fettgewebe Triglyceride abgegeben. Sie hemmen den Transport von Leptin durch die Blut-Hirn-Schranke, im Gehirn wird Hungergefühl wach und gleichzeitig wird die Peripherie Leptin-resistent. Triglyceride sind demnach sowohl bei Hunger als auch bei Übergewicht erhöht (Banks

<sup>16</sup>Arcuater, ventromedialer und dorsomedialer Kern im Hypothalamus

<sup>17</sup>auch bei Salz ist der menschliche Körper nicht auf die hohen Werte eingestellt, die heutzutage leicht erreicht werden. Der frühe Mensch hatte nur wenig Salz zur Verfügung und der Körper versucht deshalb, möglichst viel davon in der Niere zurückzugewinnen

(2008)). Bei 30% der Übergewichtigen zirkuliert nur wenig Leptin im Blut, und eine Behandlung mit Leptin wäre sinnvoll. Das gilt auch für Menschen mit einem defekten Leptin-Gen, die ständig hungrig sind.

Leptin wird nicht nur im Fettgewebe, sondern auch im Magen, in der Leber, im Ovar und in der Plazenta synthetisiert. Teure physiologische Funktionen wie die Fortpflanzung werden nur möglich, wenn genügend Leptin vorhanden ist<sup>18</sup> (Hilerman et al. (2000)).

Wie bereits erwähnt, spielt das Hormon Leptin und seine untergeordneten Signale eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energiegleichgewichts. Leptin unterdrückt die Nahrungsaufnahme und fördert Energie-intensive neuroendokrine Prozesse wie die Fortpflanzung. Das Steroidhormon Östrogen steht dabei an zentraler Stelle und trägt wie Leptin ebenfalls zur Regulation des Energiegleichgewichts bei. Östrogenmangel verstärkt die Nahrungsaufnahme und erhöht das Körpergewicht, erleichtert also die Wirkung des Leptins. Zum Zusammenspiel von Östrogen, Leptin und Energie-Homöostase siehe Gao and Horvath (2008). Körpergewicht, Energiehaushalt und die hormonellen Steuerungen spielen bei der Fortpflanzung eine Rolle (Augustine et al. (2008), Blüher and Mantzoros (2007) Blüher and Mantzoros (2007), Casanueva and Dieguez (1999)). Hill et al. (2008) stellt dar, wie die reproduktive Achse auf den Energie- und Stoffwechselzustand des Körpers reagiert und welche Hirnareale dabei beteiligt sind. Leptin und Insulin wirken über den klassischen Stoffwechsel-Weg im arcuaten Kern, über NPY/AgRP- und POMC/CART-Neuronen, und über das kürzlich entdeckte Kisspeptin-Netzwerk.

<sup>18</sup>durch Leptin wird die Menstruation initiiert

Andere hypothalamische Kerne spielen in diesem Puzzle von Stoffwechselzustand und reproduktiver Funktion eine Rolle.

In dem Zusammenhang ist auch interessant, dass in den letzten 30 Jahren die Pubertät von Mädchen immer früher einsetzt. Das im gleichen Zeitraum zunehmende Körpergewicht dieser Kinder scheint ein Hauptfaktor zu sein. Die Daten sprechen dafür, dass die Gewichtszunahme Ursache für die frühere Geschlechtsreife ist und nicht umgekehrt. Leptin scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Mäuse und Menschen mit Leptin-Mangel treten nicht in die Pubertät ein, wenn kein Leptin verabreicht wird. Bereits sehr geringe Leptin-Mengen stimulieren die Gonadotropin-Sekretion sowohl auf der Ebene des Hypothalamus als auch auf der der Hypophyse. Leptin ist dabei die Voraussetzung und nicht das kritische Stoffwechselsignal, um die Pubertät einzuleiten. Auf diese Weise wird sicher gestellt, dass Schwangerschaft und Milchproduktion erst eintritt, wenn genügend Fettspeicher vorhanden ist, um Mutter und das wachsende Kind zu ernähren (Kaplowitz (2008), Mircea et al. (2007)). Während der Schwangerschaft sorgen dann hormonelle Anpassungen im Hypothalamus der Mutter dafür, dass trotz steigendem Leptinspiegel Nahrung aufgenommen wird, die als Fett gespeichert wird und den hohen Stoffwechsel während der späteren Schwangerschaft und der Milchproduktion decken kann (Augustine et al. (2008)). Gegenspieler des Leptins ist Ghrelin, das die Gonadotropin-Sekretion hemmt, verhindert, dass die Pubertät beginnt und direkt hemmend auf die Gonaden einwirkt (Tena-Sempere (2008b)). Auch die Sekretion des luteinisierenden Hormons wird gehemmt (Tena-Sempere (2008a)).

Leptin ist nötig für den Ovarzyklus und

greift auf der Ebene des Hypothalamus, der Hypophyse und der Gonaden ein. Es ist in der Muttermilch vorhanden und für die neuroendokrine Kontrolle der Sekretion des Wachstumshormons nötig. Leptin teilt dem Hypothalamus und anderen neuroendokrinen Arealen mit, wie der Zustand des Fettdepots ist, sodass sich das neuroendokrine System auf die Situation der Energie-Homöostase einstellen kann (Casanueva and Dieguez (1999)).

**Obestatin** ist ein Peptid, das im Gegensatz zu Ghrelin den Appetit hemmt (Germain et al. (2008)). Es hat einen circadianen Rhythmus und seine Konzentration ist bei Anorexie erhöht.

**Adiponektin** ist ein Peptidhormon, das in den Fettzellen beim Menschen und bei Tieren gebildet wird. Es reguliert zusammen mit Leptin, Insulin und anderen Hormonen das Hungergefühl und die Nahrungsaufnahme. Es verstärkt die Wirkung des Insulins an den Fettzellen. Enthalten die Fettzellen viel Fett, wird wenig Adiponektin produziert; bei wenig Fett wird die Produktion gesteigert. Übergewichtige haben einen niedrigen Adiponektin-Spiegel. Dadurch wirkt Insulin weniger. Zusammen mit genetischen Faktoren erhöht ein niedriger Adiponektin-Spiegel die Gefahr, Diabetes zu bekommen, wodurch die Gefäße geschädigt werden. Ein hoher Adiponektinspiegel schützt vor Diabetes. Adiponektin beschleunigt den Abbau von Fett, wie Tierversuche zeigen.

**Resistin** ist ein Cystein-reiches Protein, das bei Mäusen und Ratten<sup>19</sup> vom Fettgewebe abgegeben wird. Es könnte an der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) beteiligt sein. Der Resistin-Gehalt im Blutserum ist bei Übergewicht der

Maus erhöht (Lee et al. (2003)). Es könnte eine Verbindung zwischen Stoffwechsellsignalen, Entzündungen und Arteriosklerose darstellen.

**Visfatin** ist ein weiteres Adipocytokin, das von Darm-Fettzellen abgegeben wird. Es erniedrigt wie Insulin den Zuckergehalt im Blut, indem es die Glukoseaufnahme durch Muskeln und Fettzellen stimuliert. Im Gegensatz zu Insulin ist aber seine Konzentration niedriger und unabhängig von der Nahrungsaufnahme konstant. Es wirkt auf Insulinrezeptoren, kompetitiert aber nicht mit Insulin.

Fettzellen sind also nicht nur Fettspeicher, sondern dynamische Zellen, die für die Energie-Homöostase zuständig sind, aber auch für andere Aufgaben (wie die Cytokine). Durch die circadiane Uhr kann das Fettgewebe und weitere Gewebe die Änderungen im Glukose-, Fettsäure- und Triglyceridspiegel und auch die Änderungen von Hormonkonzentrationen (Insulin, Adrenalin) im Körper voraussehen und ihn für die erwarteten Reize in Bereitschaft versetzen, sodaß er schnell darauf reagieren kann.

Da bei Säugern in fast allen Geweben autonome circadiane Uhren vorhanden sind, wurde auch im Fettgewebe danach gesucht (Otway et al. (2008)). 24 Stunden-Rhythmen wurden in 20% des Fettgewebe-Transkriptoms gefunden. Da sich aber dieses Gewebe aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzt, wurden Kulturen von 3T3-L1 Adipocyten untersucht. Vor den Messungen wurden sie mit einem Serum-Puls behandelt, um die vermuteten circadianen Uhren zu synchronisieren. Es wurden Uhr-Gene gefunden, deren Expression circadian verläuft. Untersuchungen sollen nun prüfen, ob Synthese und Sekretion von anderen Adipokinen unter circadianer Kontrolle stehen.

<sup>19</sup>bei Primaten, Schweinen und Hunden von Immunzellen und Epithelzellen

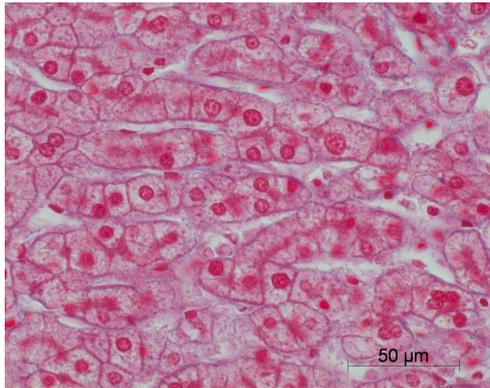


Abbildung 7.22: Leberzellen in einem Leberläppchen des Menschen. Helle Kanäle sind arterielle Blutkapillaren. Abbildung eines Präparates von Dr. Klaus Reutter

### 7.9 Leberzellen

Leberzellen (siehe Abbildung ) sind darauf spezialisiert, toxische Substanzen aus dem Blut zu entfernen und Nährstoffe und andere Substanzen, die zurzeit vom Körper nicht benötigt werden wie Kohlenhydrate als Glykogen zu speichern. Leberzellen spielen auch beim Fett- und Proteinstoffwechsel eine Rolle.

Zahlreiche Proteine<sup>20</sup> in der löslichen Fraktion der Leber werden rhythmisch exprimiert, wie differentielle Gel-Elektrophorese zeigte (Akhtar et al. (2002), Reddy et al. (2006)). Mikro-Array-Analysen ergaben aber nur 5 bis 10% rhythmische Expression aller Gene. Das deutet darauf hin, dass es neben der Transkription post-transkriptionale und post-translationale Mechanismen der Genexpression gibt, die für den circadianen Rhythmus verantwortlich sind. So sind nicht bei allen Proteinrhythmen

entsprechende mRNA-Rhythmen zu beobachten (Albrecht (2006)). Mehr als 50% der gefundenen Proteine waren bereits bekannt, unter ihnen einige Isoformen. 80% der Proteine wurden am Tage produziert (also in der Ruhephase der Mäuse). Zu dieser Zeit entgiftet die Leber und regeneriert (Turek and Allada (2002)).

Weitere transkriptom- und proteom-Untersuchungen werden helfen, die komplexen und dynamischen Abläufe in der Leber verstehen zu lernen. Jedes Gewebe scheint einen eigenen Satz oszillierender Gene zu besitzen. Im gesamten Organismus kann es also durchaus sein, dass jedes Gen circadian exprimiert wird, einige in der Leber, andere in der Niere, wieder andere im Herzen. Das ist auch sinnvoll, weil erst die verschiedenen Aufgaben und Anforderungen der jeweiligen Organe den Organismus optimal funktionieren lassen. Deshalb ist es wichtig, die physiologischen Vorgänge bei Mensch und Tier unter dem Gesichtspunkt circadianer Oszillationen zu untersuchen. Diese Systembiologie wird zeigen, wie komplexe Systeme wie Stoffwechsel und Gehirn mit dem circadianen System und der Umwelt zusammenwirken. Das wird auch zu einer integrierten Sichtweise der Therapie von Krankheiten führen, die durch systemische Fehlfunktionen bedingt sind und nicht durch spezielle molekulare Änderungen in einem besonderen Vorgang (siehe Kapitel 8).

Die circadiane Uhr steuert auch die Expression von Genen in der Leber, die für die Zellteilung bedeutend sind (Matsuo et al. (2003), Reddy et al. (2005)).

Die Uhr-Gene in den Leberzellen werden von den circadianen Uhren im SCN kontrolliert, aber die Wege und Art der Signale zur Leber waren unbekannt. Mit Hilfe von Pseudorabies-Virus, einem

<sup>20</sup>Von 642 Proteinflecken zeigten 60 einen hochsignifikanten und 135 einen signifikanten Rhythmus

transsynaptischen Markierer von Nervenbahnen, konnte die neuronale Verbindung zwischen SCN und peripherem Gewebe bei einigen physiologischen Systemen verfolgt werden. Sie benutzt sympathische und parasympathische Neuronen des autonomen Nervensystems. [Shibata \(2004\)](#) beschreibt anatomische und physiologische Experimente zur sympathischen Kontrolle der circadianen Uhren in der Leber.

### 7.10 Keratocyten

Nach [Brown et al. \(2005\)](#) kann man in seltenen Fällen auch Haarwurzel-Keratocyten kultivieren, die am Ende eines ausgezupften menschlichen Haares ([Abbildung 7.24](#)) hängen geblieben sind. Diese Zellen lassen sich wie Fibroblasten kultivieren und vermehren. Sie wurden leuchtend gemacht und das circadian abgegebene Licht gemessen. Die Periodenlängen sind mit denen der Fibroblasten vom gleichen Menschen identisch ([Abbildung 7.23](#)). Da es allerdings selten vorkommt, dass solche Zellen an den ausgezogenen Haaren bleiben, wurden diese Untersuchungen nicht weitergeführt.

## 7 Rhythmen bei Säuger-Zellen

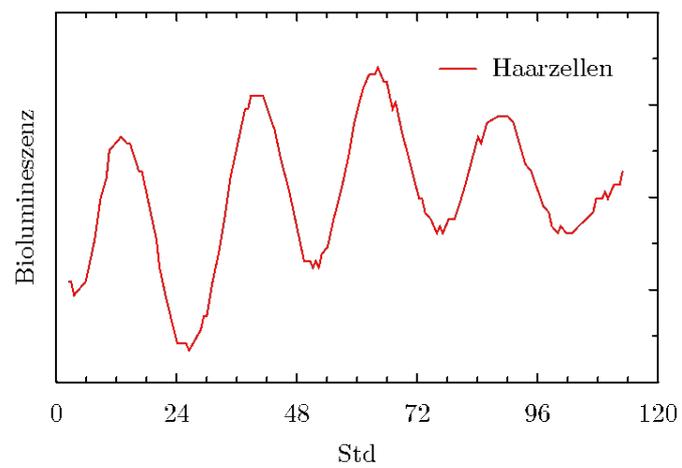


Abbildung 7.23: Keratocyt und circadianer Rhythmus der Biolumineszenz (Kurve) durch das an einen circadian kontrollierten Promoter gehängte Luciferase-Gen. Nach [Brown et al. \(2005\)](#)

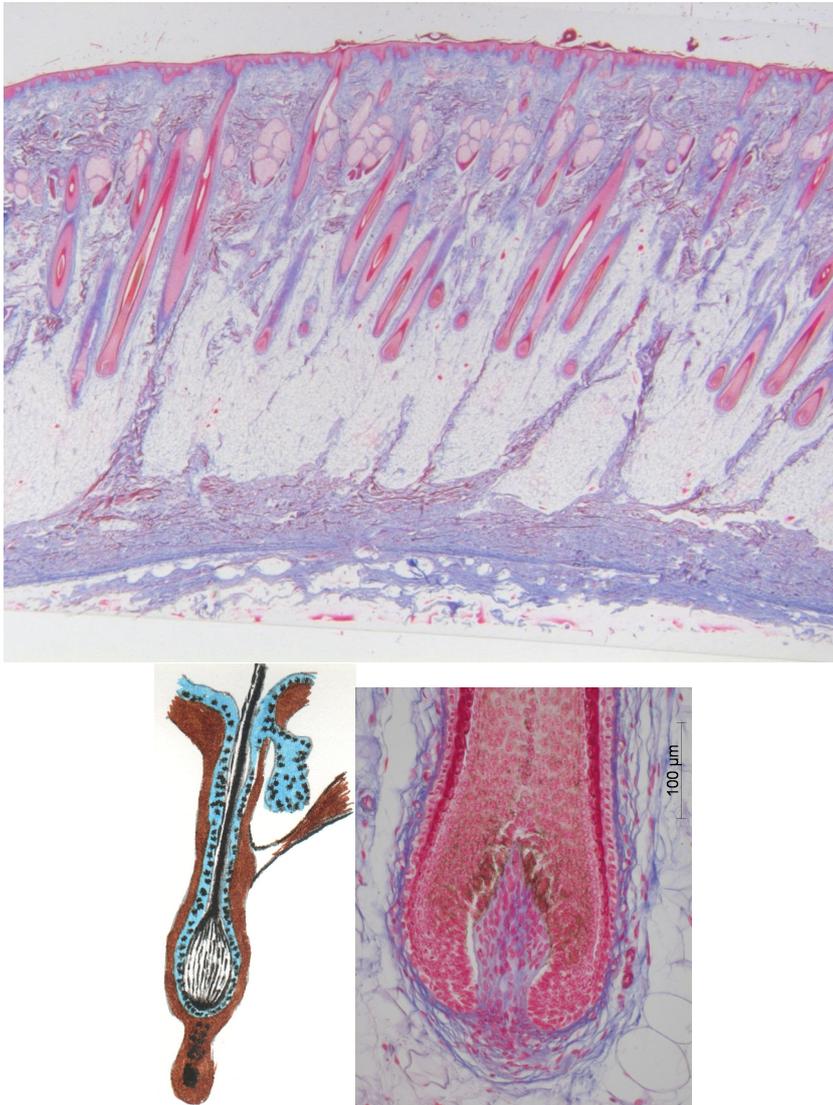


Abbildung 7.24: Oben: Hautschnitt mit mehreren angeschnittenen Haarschaften und Haarzellen, Talgdrüsen als helle Gebilde im oberen Viertel des Schnittes. Unten links: Epidermiszapfen wachsen als Haaranlagen schräg in die Lederhaut. Das untere Ende erweitert sich zwiebelartig und wird von unten durch Bindegewebe eingebuchtet (siehe rechtes unteres Bild). Keratocyt (Haarzelle, schwarz) in Haarzwiebel mit Haar (schwarz). Rechts Muskelansatz (braun) und darüber Talgdrüse (blau). Die histologischen Bilder wurden von Dr. Klaus Reutter zur Verfügung gestellt. Skizze nach einer Abbildung in [Brown et al. \(2005\)](#)

## 7 *Rhythmen bei Säuger-Zellen*

## 8 Krankheiten durch circadiane Störungen

Es hat sich gezeigt, dass eine Reihe von Krankheiten durch Störungen des circadianen Systems bedingt sind. [Klerman \(2005\)](#) gibt eine Übersicht über klinische Krankheiten, die durch diurnale oder circadiane Rhythmen verursacht oder beeinflusst sind. Auch die Nebeneffekte eines gestörten circadianen Rhythmus wie zum Beispiel durch Schichtarbeit und seine Folgen für das Gesundheitswesen werden diskutiert. Allerdings ist es schwierig, die nötigen Experimente durchzuführen, da 24-Stunden-Änderungen der Pathophysiologie oder Symptome vieler Krankheiten kausal mit endogenen circadianen Rhythmen oder anderen diurnalen Faktoren verbunden sind, die sich über den Tag hinweg ändern wie Körperposition, Aktivität, Schlaf- oder Wachzustand und mit Nahrungsaufnahme verbundene Stoffwechseländerungen. Solange die physiologischen Grundlagen nicht genau bekannt sind, lässt sich auch keine entsprechende Behandlung aufstellen.

Auf der Zellebene steuert die circadiane Uhr unter anderem die Zellteilung und lässt sie nur in einem bestimmten Zeitfenstern ablaufen ([Nagoshi et al. \(2004\)](#)). Mutationen im Mechanismus der Regulation des Zellzyklus oder in der Zellteilung selbst können zu Krebs führen ([Fu et al. \(2002\)](#), [Lowrey and Takahashi \(2004\)](#), Abschnitt 8.2). Säuger mit homozygotem Clk zeigen Freilaufunterschiede und Stoffwechselsyndrome wie Fettleibigkeit, Hyperlipidämie, Hyperglykämie, Hypoinsulinämie ([Turek et al. \(2005\)](#), Abschnitt

8.3). Eine Mutation bei Mäusen im *per2*-Gen führte zu einer anderen Phasenbeziehung ([Spanagel et al. \(2005a\)](#)) und zu einem höheren Alkoholverbrauch. Beim Menschen mit *clk*-Mutationen tritt gehäuft Alkoholismus auf (Abschnitt 8.4). Bei *clk*-Mutationen ist der Schlaf beeinflusst, desgleichen bei *BMal1*-Mutation ([Laposky et al. \(2008\)](#), Abschnitt 8.6).

Außer auf der Zellebene können circadiane Rhythmen und Krankheiten auf einer zweiten Ebene interagieren: Bestimmte Krankheiten und zum Teil fatale Ereignisse treten häufiger zu bestimmten Tageszeiten auf, zum Beispiel solche des Herzkreislaufs (Abschnitt 8.5) und der Atmung in den Morgenstunden. Das gilt für Bluthochdruck, Herzinfarkt (Herzattacken), *Angina pectoris*, Schlaganfall, Arrhythmie, plötzlicher Herztod, Stauungsinsuffizienz (congestive heart failure, [White \(2007\)](#)). Herzarterien-Plaques platzen am häufigsten zwischen 6 und 12 Uhr auf. Apnoe, endokrine, rheumatologische und nächtliche Hyperglykämie sowie epileptische Anfälle haben ihre besonderen Zeiten. Umgekehrt ist auch die Therapie oft wirksamer, wenn bestimmte Phasen des Tagesrhythmus berücksichtigt werden, zum Beispiel beim Verabreichen von Medikamenten.

Auf einer dritten Ebene kann das Verhalten mit dem circadianen System in Konflikt treten, wie bei Nacht-, Schicht- und Rotationsarbeit. Bei Schichtarbeitern, die unregelmäßigen Licht-Dunkel-Wechseln ausgesetzt sind, ist der Schlaf-Wach-Rhythmus und der Essens-

Rhythmus gestört. Das führt häufig zu Herz-Kreislaufkrankheiten, Fettleibigkeit, Diabetes und anderen Stoffwechselerkrankungen. Der Plasmalipid-Stoffwechsel ändert sich, oxidativer Stress nimmt zu. Gewichtszunahme durch kürzeren Schlaf und Schichtarbeit sind wohl dokumentiert, obwohl der Mechanismus noch nicht verstanden ist.

Da auf diesem Gebiet sehr viele Arbeiten veröffentlicht wurden, beschränke ich mich im folgenden auf einige Beispiele, wobei einige Fälle bereits in Kapitel 7 erwähnt wurden.

### 8.1 Augen, SCN, Blinde Menschen

Bei Abnormalitäten in Organen kann das circadiane System gestört sein, und umgekehrt kann ein gestörtes circadianes System die Funktion von Organen beeinflussen (siehe Abbildung 8.1). So sind bei Schäden im SCN die peripheren Gewebe nicht mehr synchronisiert (Lowrey and Takahashi (2004), Czeisler et al. (1989)). Sind die Eingänge von der Retina zum SCN ausgefallen, wie bei manchen Blinden, ist die Synchronisation des Schlaf-Wach- und Aktivitätsrhythmus, des Körpertemperatur-Rhythmus und der peripheren Oszillatoren gestört. Das ist aber nicht bei jedem Blinden der Fall, da es zwei verschiedene Photorezeptor-Systeme in der Retina gibt, eins für das normale und eins für das circadiane Sehen (Czeisler et al. (1995)). Ist das letztere noch in Takt, werden auch der SCN und die von ihm gesteuerten peripheren Oszillatoren noch mit dem Licht-Dunkel-Wechsel des Tages synchronisiert.

Gestörte Ausgänge des SCN können ebenfalls zu Krankheiten oder Unpass-

lichkeiten führen. So ist die Konzentration des antidiuretischen Hormons ADH normalerweise in der Nacht hoch. Bei älteren Menschen ist aber der Rhythmus gedämpft. Dadurch wird in der Nacht mehr Urin produziert und der Schlaf wird durch Harn lassen gestört. Schlafstörungen kommen auch durch eine abnormale Phasenlage des SCN-Rhythmus zustande oder durch eine gestörte Synchronisation. Zum Beispiel führt eine Mutation der CKI-Bindungs-Domäne des Per2-Gens zu dem nicht-24-h-Schlafsyndrom, bei dem der Schlaf-Wach-Rhythmus nicht mehr synchronisiert ist (Hashimoto et al. (1998)).

### 8.2 Zellteilungen und Krebs

Die circadiane Uhr lässt die Zellteilung nur in einem bestimmten Zeitfenster ablaufen (Nagoshi et al. (2004)). Mutationen im Mechanismus dieser Regulation des Zellzyklus einschließlich der Zellteilung können zu Krebs führen (Fu et al. (2002), Lowrey and Takahashi (2004)). So wurde bei Polymorphismus des Per3-Gens ein früher Brustkrebs gefunden (Zhu et al. (2005)). Bei Abnormalitäten im per1- per2- und per3-Gen traten ebenfalls Tumoren auf (Chen et al. (2005) und Abbildung 8.2).

Allerdings muss man bei der Interpretation vorsichtig sein: Gauger and Sancar (2005) berichten, dass eine Störung der circadianen Uhr das Brustkrebsrisiko der Frau erhöht und bei der Maus die durch ionisierende Strahlung induzierte Tumorate und Mortalitätsrate verstärkt. Cryptochrom 1- und Cryptochrom 2-Proteine sind Uhr-Komponenten der circadianen Uhr von Säugern. Mäuse mit Mutationen in beiden Cryptochrom-Genen sind arrhythmisch. Um zu testen, ob die von Gau-

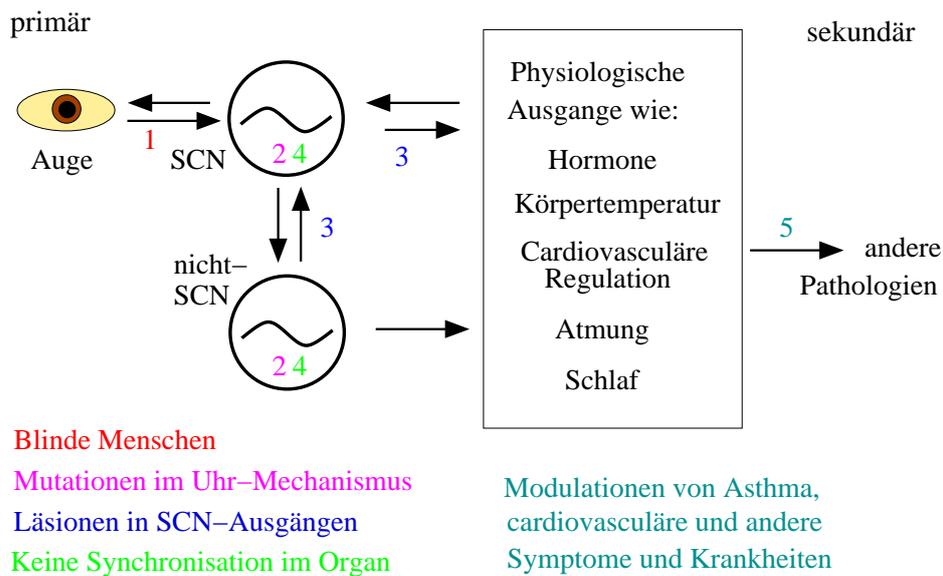


Abbildung 8.1: Verschiedene Möglichkeiten von Störungen im circadianen System, die zu Krankheiten führen können. Nach *Klerman (2005)*

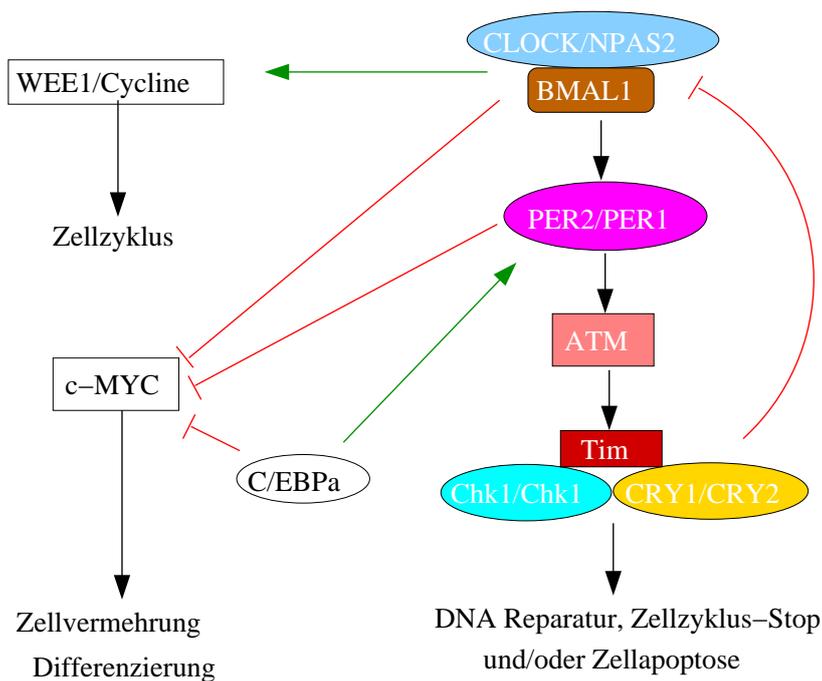


Abbildung 8.2: Tumoren und Zellzyklus-Störungen

ger and Sancar (2005) aufgestellte These einer erhöhten Tumor- und Mortalitätsrate durch eine gestörte circadiane Uhr stimmt, wurden Cry1/Cry2 Mäuse und von ihnen gewonnene Fibroblasten auf Strahlungsinduzierten Krebs, DNA-Schäden und auf Absterben untersucht. Die Cry1/Cry2-Mäuse unterschieden sich aber nicht von den Wildtyp-Kontrollen. Auch die Fibroblasten der Cry1/Cry2-Mutanten hatten die gleiche Empfindlichkeit auf ionisierende und UV-Strahlung wie die Wildtyp-Kontrollen. DNA-Reparatur und DNA-Schäden nach Bestrahlung sind bei arrhythmischen Tieren nicht anders als bei den rhythmischen Kontrolltieren.

### 8.3 Ernährung, Fettleibigkeit und Diabetes

Übergewicht ist in neuerer Zeit in vielen Gesellschaften eine Epidemie geworden. Es kommt zustande, weil zu viel gegessen wird (Hyperphagie) und zu wenig Energie abgegeben wird. Dadurch sammelt sich zu viel Fett im Körper. Es ist ein Risikofaktor für Diabetes, Krebs, kardiovaskuläre und andere Krankheiten. In den USA sind mehr als die Hälfte der Bevölkerung übergewichtig und die Zahl steigt weiter an. Der Fettgehalt des Körpers hängt vom ethnischen Hintergrund ab, vom Geschlecht, dem Entwicklungsstadium und dem Alter. Bereits im Fötus wird auf der parakrinen/autokrinen Ebene die Entwicklung des Fettgewebes festgelegt (Kiess et al. (2008)). Ernährungs- und hormoneller Zustand während der Schwangerschaft und der frühen Kindheit können irreversibel die Entwicklung der Organe, die an der Nahrungsaufnahme und -verarbeitung beteiligt sind, und die hypothalamischen Strukturen, die für das

Verhalten bei der Nahrungsaufnahme und der Energie-Gleichgewichts-Kontrolle zuständig sind, beeinflussen. Bei dieser frühen Programmierung scheint Leptin eine kritische Rolle zu spielen (Djiane and Attig (2008)).

Auch bei konstitutioneller Magerkeit und Anorexie (Anorexia nervosa) sind Appetit-regulierende Hormone am Energiegleichgewicht der Fettzellen beteiligt (Loucks (2007)). Während Ghrelin (ein orexigenes Hormon, siehe Sakurai (2006)) bei konstitutioneller Magerkeit zu normalem Essverhalten führt, hat ein erhöhter Ghrelin-Spiegel keine Wirkung. Ghrelin reguliert die Sekretion des Wachstumshormons und die Homöostase des Energiehaushalts. Zirkulierendes Ghrelin schwankt ultradian. Fettzellen können bestimmte Hormone wie Leptin in geordneten Mustern, andere wie Adiponektin in ungeordneten Mustern abgeben. Ghrelin im Plasma steigt bei schlanken Menschen nachts an, während es bei Übergewichtigen keinen Rhythmus zeigt (Yildiz et al. (2004)).

Eine weitere Krankheit durch Übergewicht ist Hypoventilation. Die Mortalitätsrate ist hoch. Leptinmangel oder Leptinresistenz bei Übergewicht beeinflusst den zentralen Atem-Antrieb, reduziert das Atmen und führt zu Hypoxie (Piper and Grunstein (2007)).

Leptin ist auch in der Peripherie aktiv. Es kann die Insulin-Empfindlichkeit modifizieren, den Stoffwechsel im Gewebe, Stressreaktionen und reproduktive Funktionen. Neben einer zentralen "Leptin-Resistenz" bei übergewichtigen Personen gibt es auch eine periphere Leptin-Resistenz (Harris (2000)).

Übergewicht scheint Asthma, atopische und autoimmune Krankheiten zu verursachen, indem die immunologische Toleranz

gegen Antigene verringert wird. Schwangere scheinen diese Intoleranz auf den Fötus zu übertragen (Hersoug and Linneberg (2007)).

Zusammenhänge zwischen circadianen und Stoffwechsel-Systemen und ihre Bedeutung für cardiovaskuläre Krankheiten, Fettleibigkeit und Diabetes sind von Green et al. (2008) dargestellt.

Die circadiane Uhr kontrolliert die Nahrungsverwertung und die Homöostase der Energie, indem sie die Expression und/oder Aktivität von Enzymen steuert, die am Cholesterin-, Aminosäure-, Fett-, Glykogen- und Glukose-Stoffwechsel beteiligt sind (siehe Abbildung 8.3).

Darüber hinaus werden zahlreiche Hormone des Stoffwechsels wie Insulin, Glukagon, Adiponektin, Corticosteron, Leptin und Ghrelin circadian ausgeschüttet. Störungen des circadianen Rhythmus können zu Krebs, Stoffwechselsyndromen und Fettleibigkeit führen (Abbildung 8.4). Andererseits wirken Stoffwechsel und Nahrungsaufnahme auch auf die circadiane Uhr zurück. Kalorienbeschränkung synchronisiert die Uhren im SCN, während auf bestimmte Zeit begrenzte Nahrung periphere Oszillatoren synchronisiert. Weiterhin können der Redoxzustand der Zellen, der durch den Nahrungsstoffwechsel bestimmt wird, und bestimmte Stoffe wie Glukose, Alkohol, Adenosin, Kaffein, Thiamin und Retinsäure circadiane Rhythmen Phasen-verschieben (Froy (2007)).

Sowohl über den SCN als auch über die veränderten Nahrungsaufnahme-Muster können periphere Oszillatoren beeinflusst werden. Es fehlt dann die richtige Kommunikation zwischen SCN, Umwelt und peripheren Zielorganen/Geweben, die aber für die Regulation des Körpergewichtes entscheidend ist. Mögliche Zeitgeber für die peripheren Uhren sind

Glukokortikoide, Retinoinsäure und Melatonin, die das Nahrungsverhalten steuern und vermitteln. Dabei spielen Sättigungsfaktoren (Leptin, Ghrelin) eine Rolle, deren Rhythmus unabhängig von der Nahrungsaufnahme verläuft (Anubhuti and Arora (2008), Yildiz et al. (2004)). Zur Pathogenese der Fettleibigkeit siehe Bray and Young (2007), Scott and Grant (2006), Turek et al. (2005). Lipogenese, Speicherung und Lipolyse verlaufen im Fettgewebe rhythmisch (Ando et al. (2005), Alonso-Vale et al. (2008)). Der Energiestoffwechsel des gesamten Körpers und der spezifischer Organe unterscheidet sich. Wird bei Tieren der SCN entfernt, verschwindet der Leptin-Rhythmus und der Schlaf-Rhythmus ändert sich.

Übergewicht entsteht nur, wenn mehr Energie aufgenommen als abgegeben wird. Die Nahrungszusammensetzung wirkt sich aber auch auf das Energiegleichgewicht aus. Fett spielt dabei eine besondere Rolle, weil es sowohl auf der Ebene des Verbrauchs als auch der Verbrennung schlecht reguliert wird. Psychologische und Verhaltens-Profile der Übergewichtigen sind wichtig, weil sie die Nahrungswahl und das Essmuster beeinflussen. Es ist noch unklar, was die Häufigkeit der Mahlzeiten beim Übergewicht für eine Rolle spielt. Essstörungen sind am Übergewicht beteiligt, aber ob sie Ursache oder Ergebnis sind, ist unsicher. Diät kann auch zu übermäßigem Essen führen. Frühe Stadien der Fettablagerung vergrößern die vorhandenen Fettzellen (Hypertrophie) und in späteren Stadien werden neue Fettzellen gebildet (Hyperplasie). Bei dieser Umwandlung könnten auch spezifische Komponenten der Diät wie poly-ungesättigte Fettsäuren oder Proteine eine Rolle spielen. Das kritische

## 8 Krankheiten durch circadiane Störungen

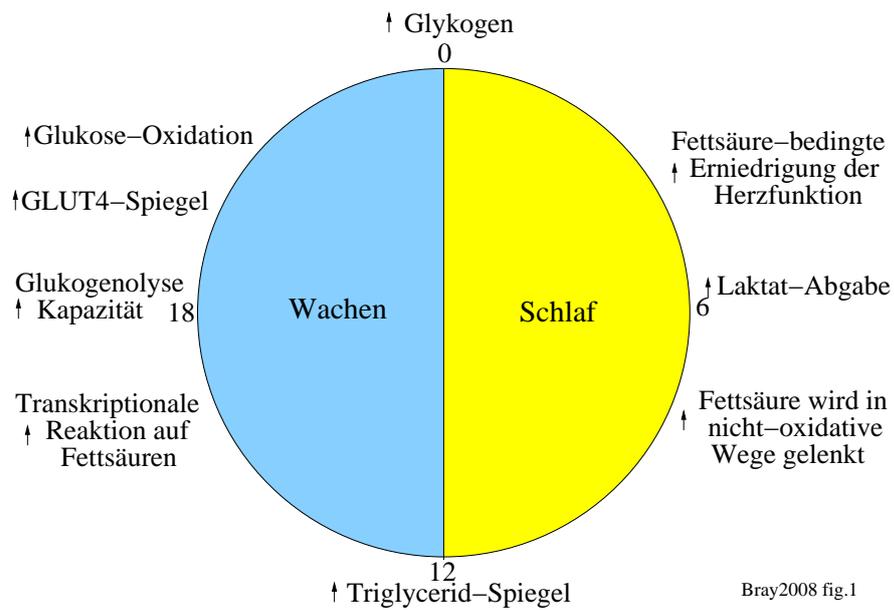


Abbildung 8.3: Maxima verschiedener Stoffwechsel-Vorgänge bei der Ratte, Zeitgeber-Zeiten 0 bei Lichtbeginn, 12 bei Lichtende im 12:12- Licht-Dunkel und im Dauerdunkel

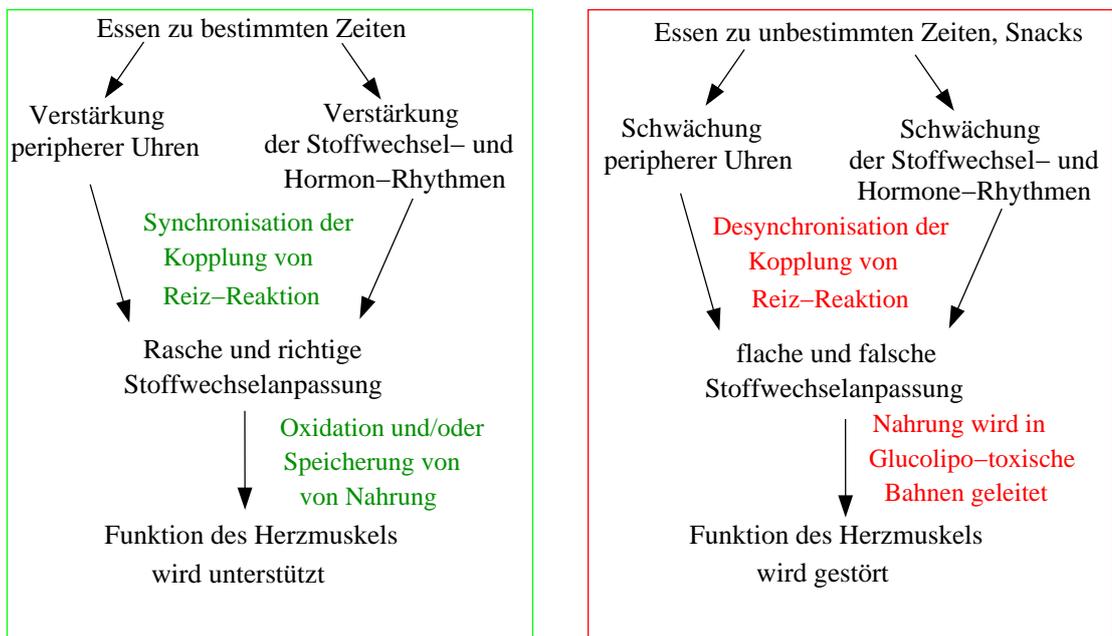


Abbildung 8.4: Was regelmäßige Esszeiten für die Gesundheit bedeuten

Alter für späteres Übergewicht ist bei Kindern niedriger, die viel Proteine essen, möglicherweise bereits in früher Kindheit oder gar im Fötus (Ziegler et al. (2000)).

Fett reiche Ernährung bei Nagern führt zu Stoffwechselkrankheiten, die dem Stoffwechselsyndrom des Menschen wie Übergewicht und Insulinresistenz ähnelt. Dabei ändert sich auch die Zeitstruktur vieler physiologischer Funktionen. Um herauszufinden, ob Fett-reiche Nahrung (hyperkalorische Diät) auch die Uhr im SCN beeinflusst, wurde die Synchronisation von Mäusen durch Licht bei Fett-reicher und Fett-arter Diät für drei Monate untersucht. Als Zeiger der Uhr wurde die Laufradaktivität und die Körpertemperatur gemessen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten die Fett-reich ernährten Tiere einen höheren Körpergewichts-Index, Hyperleptinämie, höheren Glukosegehalt im Blut und eine angestiegene Insulinämie. Gleichzeitig war bei diesen Tieren die Synchronisation der Uhr durch Licht beeinträchtigt. Wurde die innere Uhr durch einen geänderten Licht-Dunkel-Wechsel einem Jet-lag von 6 Stunden ausgesetzt, verfrühte sich der Rhythmus weniger schnell. Auch auf der molekularen Ebene gab es Unterschiede bei den Licht-induzierten Phasenverschiebungen (c-FOS und P-ERK<sup>1</sup> reduziert).

<sup>1</sup>c-Fos gehört zu der 'immediate early gene' Familie von Transkriptionsfaktoren. Die Transkription wird durch viele extrazelluläre Signale hochreguliert. Phosphorylierung ändert die Aktivität und Stabilität. Mitglieder der Fos Familie dimerisieren mit Jun und bilden den AP-1 Transkriptionsfaktor, der die Transkription verschiedener Gene hochreguliert, die zum Beispiel an der Teilung und Differenzierung beteiligt sind. c-fos wird als ein Marker neuronaler Aktivität verwendet, da es beim Feuern von Neuronen auftritt.

P-ERK ist ein Initiierungsfaktor bei der Trans-

Fett-reiche Nahrung modifiziert also die circadiane Synchronisation durch Licht (Mendoza et al. (2008a)).

Die Synchronisation der zentralen circadianen Uhr im SCN durch Futtergabe ist bei Nagern erfolgreicher, wenn sie zeitlich und Kalorien-mäßig begrenzt erfolgt, zum Beispiel durch eine einzige Mahlzeit am Tage zur gleichen Zeit. Da aber die gleiche Fütter-Zeit mit der hypokalorischen Bedingung zusammenfällt, wurde ein ultradianes Füttermuster mit sechs Mahlzeiten pro Tag (6 mal 8-Minuten, knappes Futterangebot, und 6 mal 12-Minuten, reichliches Futterangebot) angewendet. Die täglichen beziehungsweise circadianen Rhythmen der Laufradaktivität und der Körpertemperatur wurden beim knappen Futterangebot phasenverschoben (Rhythmus wird sowohl verfrüht als auch verzögert). Bei den ausreichend gefütterten Ratten ohne Gewichtsverlust war der Rhythmus wenig oder nicht verschoben. Damit wird gezeigt, dass kalorische Begrenzung den SCN trotz Licht-Dunkel-Wechsel auf den Zeitpunkt des Fütterns synchronisiert (Mendoza et al. (2008b)).

Schließlich sei darauf hingewiesen, dass Fettleibigkeit und Insulin-Resistenz bei Säugern, die überwintern müssen, einen Selektionsvorteil besitzt. Nach einer Hypothese von Neel (1962) traf das auch auf Menschen zu, für die es früher von Vorteil war, wenn akute, physiologische und vorausschauende Vorgänge den Körper auf Nahrungsmangel im Winter einstellten (einschließlich T2DM). Heutzutage ist das allerdings pathologisch und schädlich (siehe Scott and Grant (2006)).

lution von Eukaryonten

## 8.4 Alkohol und andere Drogen

Wie bereits erwähnt, führt eine *per2*-Mutation bei Mäusen zu einer anderen Phasenbeziehung (Spanagel et al. (2005a)) und zu einem höheren Alkoholverbrauch. Beim Menschen tritt bei dieser Mutation gehäuft Alkoholismus auf. Bei *clk*-Mutationen ist der Schlaf beeinflusst, desgleichen bei *BMal1*-Mutation (Laposky et al. (2008)).

Alkohol-Stoffwechsel (Chronokinetik) und -Wirkung (Chronotoxizität) verlaufen circadian. Auch die Zielorgane reagieren tagesperiodisch auf Alkohol (Chronästhesie) (Danel and Touitou (2004)). Das Fahrvermögen wird durch Alkohol verringert, und zwar auch bei niedrigen Blutwerten. Alkohol erhöht die Kollisionsgefahr und auch die Heilungschancen bei Unfällen. Aufmerksamkeit und mentale Belastung werden beeinträchtigt. Kaum untersucht ist, wie Drogen wie Marihuana, Benzodiazepine und andere psychoaktive Mittel (Stimulantien und Narkotika) wirken (Ogden and Moskowitz (2004)).

Spanagel et al. (2005b) untersuchten, wie Alkohol und Uhr-Gene bei Mäusen interagieren. Bei Alkohol-bevorzugenden Mäusestämmen ist der circadiane Rhythmus des Verhaltens geändert. Auf der neuronalen Ebene ändert Alkohol das circadiane Expressionsmuster der *per*-Gene in verschiedenen Hirnregionen einschließlich des SCN. Die *per2*-Gen-Aktivität reguliert die Alkoholaufnahme, indem sie über den Glutamat-Wiederaufnahme-Mechanismus auf das glutamaterge System wirkt. Dadurch werden eine Reihe physiologischer Vorgänge beeinflusst, die von der circadianen Uhr kontrolliert werden. Neben neurochemischen werden

auch neuroendokrine und immunologische Funktionen gestört<sup>2</sup>.

## 8.5 Herz-Kreislauf-Störungen

Bekanntlich führen cardiovaskuläre Krankheiten wie Stauungs- und Coronar-Insuffizienz zu Schlafstörungen. Weniger bekannt ist, dass bestimmte physiologische Ereignisse während des Schlafs und langzeitiger Schlafmangel zu Bluthochdruck, Arteriosklerose, Herzschlag und Herzarrhythmie führen kann. Chronischer Schlafmangel ist ein Risikofaktor für Übergewicht und seiner visceralen Form, die dem metabolischen Syndrom zugrunde liegt. Obstruktive und zentrale Schlaf-Apnoe sind mit der heutigen Übergewicht-Epidemie verbunden und erhöht die Gefahr des Herzschlags oder der ischämischen Attacke (Plante (2006)).

Beginn und Symptome von Krankheiten wie Herzinfarkt, Angina pectoris, Herzschlag, ventrikuläre Tachykardie hängen von der circadianen Phase ab. Herzinfarkt, Angina pectoris und stille Ischämie bei stabiler Angina treten vor allem zwischen 8 und 12 Uhr auf. ECG-Abnormalitäten und Angina-Attacken bei instabiler Angina kommen vor allem nachts. Blutdruck und Herzrate sind bei normotonen und primären Hochdruck-Patienten am Tag am höchsten, sinken in der Nacht und steigen am Morgen wieder an. 70% der sekundären Hochdruckpatienten haben keinen rhythmischen Verlauf oder zeigen sogar einen nächtlichen Anstieg. Verschiedene Typen einer Krankheit können also verschiedene circadiane Muster der Symptome zeigen. Die medikamentöse Behandlung muss dem Rechnung tragen und zu den jeweils günstigsten Zeiten erfolgen.

<sup>2</sup>siehe jedoch Zghoul et al. (2007)

Die Pharmakokinetik ändert sich ebenfalls im Laufe des Tages (gezeigt für verschiedene cardiovaskuläre Medikamente wie Propranolol, Nifedipin, Verapamil, Enalapril, Isosorbid-5-Mononitrat, Digoxin und andere (Lemmer (1999))).

### 8.6 Schlafstörungen, Übergewicht, Depressionen

Schlafmangel beeinflusst endokrine Funktionen und den Stoffwechsel. So steigt der Cortisolspiegel am Nachmittag und frühen Abend an. Als Folge erhöht sich der Glukocorticoid-Spiegel, was zu Gedächtnisdefiziten führen kann, wie sie im Alter auftreten. Chronischer Schlafmangel kann also den Alterungsprozess beschleunigen. Auch die Kohlenhydrat-Toleranz wird beeinflusst, wodurch das Risiko für Diabetes steigt. Schließlich spielt der Schlaf auch eine wichtige Rolle im Energiegleichgewicht. Partieller Schlafentzug erniedrigt den Plasmaspiegel von Leptin und erhöht den von Ghrelin; Hunger und Appetit steigen (aber nicht für Protein-reiche Nahrung). Die neuroendokrine Regulation von Appetit und Nahrungsaufnahme wird also durch die Schlafdauer beeinflusst, und Schlafmangel kann zu Übergewicht führen (Copinschi (2005)).

Ursache der Fettleibigkeit kann ein geänderter Schlaf-Wach-Rhythmus sein. Dadurch ändert sich die Synchronisation des SCN durch den LD-Wechsel<sup>3</sup>. Die Lipolyse im Fettgewebe erfolgt rhythmisch: In der Nacht nimmt sie zu, am Nachmittag ab<sup>4</sup>.

<sup>3</sup>Bei Nagern wie dem sibirischen Hamster (12) wird im Kurztag über die Kontrolle des SCN das Körpergewicht erhöht. Der Körper bereitet sich so auf den Winterschlaf vor.

<sup>4</sup>In der Mutante T1DM nimmt dagegen die Lipolyse früher zu und bleibt während der Nacht hoch

Bei Schlafmangel kommt es zu Stoffwechselstörungen und Fettleibigkeit, die leicht zu Diabetes (T2DM) führen können. In einer Studie mit tausend Patienten konnte gezeigt werden, dass die Fettleibigen die kürzeste Schlafdauer hatten (im Mittel um 15 Minuten kürzer), am Tag schläfriger waren und einen gestörteren Nachtschlaf hatten als die Normalgewichtigen. Fettleibigkeit ist nach diesen Untersuchungen Umwelt-bedingt, hat aber auch genetische Komponenten. Beides führt zu erhöhter Nahrungsaufnahme und der Energiestoffwechsel wird beeinträchtigt. Molekulare Studien dazu sind von Larkin et al. (2005), Larkin (2006) und Iitaka et al. (2005) gemacht worden.

Schließlich gibt es auch Zusammenhänge zwischen circadianen Rhythmen, Schlafstörungen und Depressionen (Germain and Kupfer (2008)): Man unterscheidet zwischen nichtsaisonalen und saisonalen Depressionen. Letztere treten oft im Winter auf und werden als Seasonal Affective Disorders (SAD) bezeichnet. Winterdepressionen gehen zum Teil mit einer Hypomanie im Frühling einher. Zur Übersicht siehe Levitan (2007). Depressive haben eine höhere Selbstmordrate. Sie schwankt circadian und jahresrhythmisch (van Houwelingen and Beersma (2001)) und steigt mit steigender Lichtintensität der Sonne (Lambert et al. (2003), Björkstén et al. (2005), Koenigsberg (1984)).

Schlafstörungen sind häufig bei Depression zu beobachten: 90% der Depressiven haben Schwierigkeiten, einzuschlafen, durchzuschlafen oder wachen zu früh auf, 6-30% schlafen zu viel (Roberts et al. (2000)), besonders bei Winter-SAD; Schlaflosigkeit tritt dagegen gehäuft bei Sommer-Beginn-SAD auf. Zur Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus siehe Saper et al. (2005).

## 8 Krankheiten durch circadiane Störungen

Es wurden eine Reihe von circadianen Hypothesen der Depression aufgestellt:

1. Phasenverschiebung: Der Tagesrhythmus ist verfrüht oder verspätet, was sich auch im SCN sehen lässt. Zur Therapie können starke Lichtpulse gegeben werden (Lam et al. (1999), Rosenthal et al. (1990)). Morgen- und Abendlicht verbessert den Zustand (Eastman et al. (1998), wobei Morgenlicht effektiver zu sein scheint (Lewy et al. (1998), Terman and Terman (2005)). Melatoningaben helfen bei Winter-Depressionen (Lewy (2007)). Nach Terman and Terman (2005) wird die Depression durch einen verfrühten Melatonin-Rhythmus verringert.
2. Interne Phasenkoinzidenz: Es gibt eine empfindliche Phase des circadianen Rhythmus (Borbely (1982)). Verschiebt man den Rhythmus, verringert sich die Unstimmigkeit zwischen circadianer Phase und Schlafphase (Wehr and Goodwin (1975)). Antidepressiva wie MAO-Hemmer (MAOI) können ebenfalls den Rhythmus verschieben und wirken therapeutisch (Kripke et al. (1983)).
3. Kurze REM-Latenz charakterisiert Depressionen. Wird der REM-Schlaf durch Pharmaka oder durch das Verhalten unterdrückt, verbessert sich die Stimmung (siehe jedoch Grözinger et al. (2002))
4. Vermehrter REM auf Kosten des *Slow Wave Sleep* (SWS): Nach Borbely (1982) wird dadurch der S-Prozess gestört (siehe jedoch Sharpley (1995))
5. Soziale und damit einhergehende physiologische Rhythmen sind ge-

stört (Ehlers et al. (1988), Frank et al. (1997), Grandin et al. (2006))

6. Uhr-Gen-Polymorphismus soll nach neueren Arbeiten (Bunney and Bunney (2000), Benedetti et al. (2003), Serretti et al. (2003), Serretti et al. (2005), Joyce et al. (2005)) zu Depressionen führen

Chronotherapeutische Maßnahme wurden von Epperson et al. (2004) und Goel et al. (2003) vorgeschlagen. Nach Barbini et al. (2005) soll Dunkeltherapie manische Symptome reduzieren. Schlafentzug wurde von Pflug (1976) und Wirz-Justice and van den Hoofdakker (1999) angewendet. Die Ergebnisse sind aber nicht konsistent. Lithium-Salze sind als Antidepressiva bekannt (Schou (2000); siehe auch Colombo et al. (2000), Loving et al. (2002)). Eine Therapie durch soziale Rhythmen wurde von Frank et al. (2005) angewendet.

Die Wirkung von Antidepressiva auf Depressionen, den circadianen Rhythmus und den Schlaf-Wach-Rhythmus ist von Tsuno et al. (2005), Argyropoulos and Wilson (2005) und Winokur et al. (2001) diskutiert worden. Tricyclische Antidepressiva unterdrücken den REM-Schlaf, MAOI, SSRI (selektive Serotonin-Aufnahme-Hemmer) und SNRI (Serotonin-Norepinephrin-Wiederaufnahme-Hemmer) und neue Antidepressiva wie Agomelatin (wirkt auf Melatonin- und Serotonin-Rezeptoren, San and Arranz (2008)) verfrühen die circadiane Phase (siehe Rupprecht et al. (2004)).

Weitere Literatur: Wolk et al. (2005), Oishi et al. (2005), Wijnen and Young (2006), Canaple et al. (2006), Fausto et al. (2006), Kornmann et al. (2007), Kornmann (2007), Mendoza (2007), Reddy and Maywood (2007) Maronde et al. (2007), Almon et al.

## 8.6 Schlafstörungen, Übergewicht, Depressionen

(2008), Bertolucci et al. (2008), Bussone  
(2008), Downes and Liddle (2008).

## *8 Krankheiten durch circadiane Störungen*

# Literaturverzeichnis

- Akhtar, R. A., Reddy, A. B., Maywood, E. S., Clayton, J. D., King, V. M., Smith, A. G., Gant, T. W., Hastings, M. H., and Kyriacou, C. P. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*, 12:540–550. **100**
- Akimoto, H., Kinumi, T., and Ohmiya, Y. (2005). Circadian rhythm of a TCA cycle enzyme is apparently regulated at the translational level in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Journal of Biological Rhythms*, 20:479–489. **33, 34**
- Akiyama, S., Nohara, A., Ito, K., and Maéda, Y. (2008). Assembly and disassembly dynamics of the cyanobacterial periodosome. *Molecular Cell*, 29:703–716. **11**
- Albrecht, U. (2006). Molecular orchestration of the hepatic circadian symphony. *Genome Biol*, 7:234. **100**
- Albus, H., Bonnefont, X., Chaves, I., Yasui, A., Doczy, J., van der Horst, G. T. J., and Meijer, J. H. (2002). Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei. *Curr Biol*, 12:1130–1133. **71**
- Allen, G., Rappe, J., Earnest, D., and Cassone, V. (2001). Oscillating on borrowed time: Diffusible signals from immortalized suprachiasmatic nucleus cells regulate circadian rhythmicity in cultured fibroblasts. *Journal of Neuroscience*, 21:7937–7943. **91**
- Almon, R., Yang, E., Lai, W., Androulakis, I., DuBois, D., and Jusko, W. (2008). Circadian variations in rat liver gene expression: Relationships to drug actions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326:700–716. **114**
- Alonso-Vale, M. I. C., Andreotti, S., Mukai, P. Y., das Neves Borges-Silva, C., Peres, S. B., Cipolla-Neto, J., and Lima, F. B. (2008). Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *J Pineal Res*, 45:422–429. **109**
- Ando, H., Yanagihara, H., Hayashi, Y., Obi, Y., Tsuruoka, S., Takamura, T., Kaneko, S., and Fujimura, A. (2005). Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology*, 146:5631–5636. **109**
- Antkowiak, B. (1987). Der Einfluss des pH auf die stationäre Glycolyse von *Saccharomyces carlsbergensis*. Staatsexamensarbeit, University of Bonn. **51**
- Anubhuti, V. and Arora, S. (2008). Leptin and its metabolic interactions: an update. *Diabetes Obes Metab*, 10:973–993. **97, 109**
- 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. **9, 15**
- Argyropoulos, S. and Wilson, S. (2005). Sleep disturbances in depression and

- the effects of antidepressants. *International Review of Psychiatry*, 17:237–245. 114
- Aronson, B., Johnson, K., and Dunlap, J. (1994). 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. 57
- 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. 57
- 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 *cgc-2(eas)*. *Plant Physiology*, 102:1299–1305. 59
- Augustine, R. A., Ladyman, S. R., and Grattan, D. R. (2008). From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *J Physiol*, 586:387–397. 98
- 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. 87
- Banks, W. A. (2008). The blood-brain barrier as a cause of obesity. *Curr Pharm Des*, 14:1606–1614. 97
- Barbini, B., Benedetti, F., Colombo, C., Dotali, D., Bernasconi, A., Cigala-Fulgosi, M., Florita, M., and Smeraldi, E. (2005). Dark therapy for mania: a pilot study. *Bipolar Disord*, 7:98–101. 114
- Bartness, T. J., Song, C. K., and Demas, G. E. (2001). SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms*, 16:196–204. 73
- Benedetti, F., Serretti, A., Colombo, C., Barbini, B., Lorenzi, C., Campori, E., and Smeraldi, E. (2003). Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 123B:23–26. 114
- Benson, J. and Jacklet, J. (1977). 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. 83
- 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. 38
- Bertolucci, C., Cavallari, N., Colognesi, I., Aguzzi, J., Chen, Z., Caruso, P., Foá, A., Tosini, G., Bernardi, F., and Pinotti, M. (2008). Evidence for an overlapping role of clock and *npas2* transcription factors in liver circadian oscillators? *Molecular and Cellular Biology*, 28:3070–3075. 115
- Betz, A. and Chance, B. (1965). Phase relationship of glycolytic intermediates in yeast cells with oscillatory metabolic control. *Arch Biochem Biophys*, 109:585–594. 48
- Bissonette, T. (1932). Modification of mammalian sexual cycles. I. Reactions of ferrets (*Putoris vulgaris*) of both sexes to electric light added after dark in No-

- vember and December. *Proc.Roy.Soc., Series B*, 110:332–336. [87](#)
- Björkstén, K. S., Bjerregaard, P., and Kripke, D. F. (2005). Suicides in the midnight sun—a study of seasonality in suicides in west greenland. *Psychiatry Res*, 133:205–213. [113](#)
- Block, G., Geusz, M., Khalsa, V., Michel, V., and Whitmore, D. (1995). Cellular analysis of a molluscan retinal biological clock. *Ciba Found Symp*, 183:51–60. [82](#)
- Blüher, S. and Mantzoros, C. S. (2007). Leptin in reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 14:458–464. [98](#)
- Borbely, A. A. (1982). Sleep as a dynamic process. In *CNS Pharmacology, Neuropeptides: Proceedings of the 8th International Congress of Pharmacology, Tokyo, 1981*. Pergamon. [114](#)
- 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. [17](#)
- Brainard, G. C. and Hanifin, J. P. (2005). Photons, clocks, and consciousness. *J Biol Rhythms*, 20:314–325. [84](#)
- Bray, G. A. (1965). Rhythmic changes in renal function in the rat. *Am J Physiol*, 209:1187–1192. [95](#)
- Bray, M. S. and Young, M. E. (2007). Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev*, 8:169–181. [109](#)
- Bray, M. S. and Young, M. E. (2008). Diurnal variations in myocardial metabolism. *Cardiovasc Res*, 79:228–237. [92](#)
- 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. [38](#)
- Brown, R. L. and Robinson, P. R. (2004). Melanopsin—shedding light on the elusive circadian photopigment. *Chronobiol Int*, 21:189–204. [84](#)
- Brown, S., Fleury-Olela, F., Nagoshi, E., Hauser, C., Juge, C., Meier, C., Chicheportiche, R., Dayer, J., Albrecht, U., and Schibler, U. (2005). The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biology*, 3:1813. [91](#), [93](#), [101](#), [102](#), [103](#)
- Brown, T. M., Colwell, C. S., Waschek, J. A., and Piggins, H. D. (2007). Disrupted neuronal activity rhythms in the suprachiasmatic nuclei of vasoactive intestinal polypeptide-deficient mice. *J Neurophysiol*, 97:2553–2558. [72](#)
- Bruce, V. (1970). The biological clock in *Chlamydomonas reinhardi*. *J. Protozool.*, 17:328–334. [43](#)
- Brunner, M. and Diernfellner, A. (2006). How temperature affects the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Chronobiology International*, 23:81–90. [44](#)
- Brunner, M. and Merrow, M. (2008). The green yeast uses its plant-like clock to regulate its animal-like tail. *Genes & Development*, 22:825–83. [43](#)
- Brunner, M., Simons, M. J. P., and Merrow, M. (2008). Lego clocks: building a

- clock from parts. *Genes & Development*, 22:1422–1426. 14
- Buijs, R. M., la Fleur, S. E., Wortel, J., van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T. C., Kalsbeek, A., Nagai, K., and Nijijima, A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol*, 464:36–48. 70
- Buijs, R. M., Scheer, F. A., Kreier, F., Yi, C., Bos, N., Goncharuk, X. D., and Kalsbeek, A. (2006). Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog Brain Res*, 153:341–360. 70, 79
- Bunney, W. E. and Bunney, B. G. (2000). Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology*, 22:335–345. 114
- Bussone, G. (2008). Cluster headache: from treatment to pathophysiology. *Neurol Sci*, 29 Suppl 1:S1–S6. 115
- Canaple, L., Rambaud, J., Dkhissi-Benyahya, O., Rayet, B., Tan, N., Michalik, L., Delaunay, F., Wahli, W., and Laudet, V. (2006). Reciprocal regulation of brain and muscle arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Molecular Endocrinology*, 20:1715–1727. 114
- Casanueva, F. F. and Dieguez, C. (1999). Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol*, 20:317–363. 98, 99
- Cassone, V. M. (1991). Melatonin and suprachiasmatic nucleus function. In Cassone, V. M., Klein, D. C., Moore, R. Y., and Reppert, S. M., editors, *Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock*, pages 309–323. Oxford University Press, New York. 90
- Chance, B., Pye, K., and Higgins, J. (1967). Waveform generation by enzymatic oscillators. *IEEE Spectrum*, 4:79–86. 49
- Chehab, F. F. (2008). Obesity and lipodystrophy—where do the circles intersect? *Endocrinology*, 149:925–934. 97
- Chen, S.-T., Choo, K.-B., Hou, M.-F., Yeh, K.-T., Kuo, S.-J., and Chang, J.-G. (2005). Deregulated expression of the per1, per2 and per3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis*, 26:1241–1246. 106
- Chen, T., Chen, T., Hung, L., and Huang, T. (1991). Circadian rhythm in acid uptake by *Synechococcus* RF-1. *Plant Phys.*, 97:55–59. 5
- Chow, T. and Tabita, F. (1994). Reciprocal light-dark transcriptional control of nif and rbc expression and light-dependent posttranslational control of nitrogenase activity in *synechococcus* sp. strain rf-1. *Journal of Bacteriology*, 176:6281–6285. 15
- Colepiccolo, 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. 33, 34
- Collin, J. P. and Oksche, A. (1981). Structural and functional relationships in the nonmammalian pineal gland. *The pineal gland*, 1:27–67. 90
- Colombo, C., Lucca, A., Benedetti, F., Barbini, B., Campori, E., and Smeraldi, E. (2000). Total sleep deprivation combined with lithium and light therapy in

- the treatment of bipolar depression: replication of main effects and interaction. *Psychiatry Res*, 95:43–53. **114**
- Colwell, C. S. (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. **82**
- Copinschi, G. (2005). Metabolic and endocrine effects of sleep deprivation. *Essent Psychopharmacol*, 6:341–347. **113**
- Crosthwaite, S., Dunlap, J., and Loros, J. (1997). *Neurospora wc-1* and *wc-2*: Transcription, photoresponses, and the origin of the circadian rhythmicity. *Science*, 276:763–769. **83**
- Czeisler, C., Kronauer, R., Allan, J., Duffy, J., Jewett, M., Brown, E., and Ronda, J. (1989). Bright light induction of strong (type 0) resetting of the human circadian pacemaker. *Science*, 244:1328–1333. **106**
- Czeisler, C. A., Shanahan, T. L., Klerman, E. B., Martens, H., Brotman, D. J., Emens, J. S., Klein, T., and Rizzo, J. F. (1995). Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med*, 332:6–11. **106**
- Danel, T. and Touitou, Y. (2004). Chronobiology of alcohol: from chronokinetics to alcohol-related alterations of the circadian system. *Chronobiol Int*, 21:923–935. **112**
- Davidson, M. M., Nesti, C., Palenzuela, L., Walker, W. F., Hernandez, E., Protas, L., Hirano, M., and Isaac, N. D. (2005). Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39:133–147. **93**
- Delmer, D. and Brody, S. (1975). Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Oscillation in the level of an adenine nucleotide. *J. Bacteriology*, 121:548–553. **63**
- Denault, D. L., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2001). *Wc-2* mediates *WC-1*?FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *EMBO J.*, 20:109–117. **56**
- Derouiche, A., Anlauf, E., Aumann, G., Mühlstädt, B., and Laviaille, M. (2002). Anatomical aspects of glia–synapse interaction: the perisynaptic glial sheath consists of a specialized astrocyte compartment. *Journal of Physiology-Paris*, 96:177–182. **81**
- Deusch, A., Dress, A., and Rensing, L. (1993). Formation of morphological differentiation patterns in the ascomycete *Neurospora crassa*. *Mechanisms of Development*, 44:17–31. **55**
- Devlin, P. F. (2002). Signs of the time: environmental input to the circadian clock. *J Exp Bot*, 53:1535–1550. **82**
- Djiane, j. and Attig, L. (2008). Role of leptin during perinatal metabolic programming and obesity. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 1:55–63. **108**
- Dong, G. and Golden, S. (2008). How a cyanobacterium tells time. *Current Opinion in Microbiology*, 11:541–546. **14, 16**
- Downes, M. and Liddle, C. (2008). Look who's talking: nuclear receptors in the liver and gastrointestinal tract. *Cell Metabolism*, 7:195–199. **115**
- Doyle, S. and Menaker, M. (2007). Circadian photoreception in vertebrates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 72:499–508. **84**

- Duffield, G., Best, J., Meurers, B., Bittner, A., Loros, J., and Dunlap, J. (2002). Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol*, 12:551–557. **67**
- Dunlap, J. (1993). Genetic analysis of circadian clocks. *A.R.Physiol.*, 55:683–728. **53**
- Dunlap, J. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96:271–290. **61**
- Dunlap, J. (2000). A new slice on an old problem. *Nature Neuroscience*, 3:305–306. **75**
- Dunlap, J. and Hastings, J. (1981). The biological clock in *Gonyaulax* controls luciferase activity by regulating turnover. *J Biol Chem*, 256:10509–10518. **25, 33**
- Dunlap, J., Taylor, J., and Hastings, J. (1981). The control and expression of bioluminescence in dinoflagellates. In Neilson, K., editor, *Bioluminescence: Current perspectives*. Burgess Publ. Co, Minneapolis MN. **26**
- Dunlap, J. C., Loros, J. J., Crosthwaite, S. K., Liu, Y., Garceau, N., Bell-Pedersen, D., Shinohara, M., Luo, C., Collett, M., Cole, A. B., and Heintzen, C. (1998). The circadian regulatory system in *Neurospora*. In Chaddick, M., Baumberg, S., Hodgson, D., and Phillips-Jones, M., editors, *Microbial Responses to Light and Time*, pages 279–295. University Press Cambridge. **56, 58**
- Durgan, D., Hotze, M., Tomlin, T., Egbejimi, O., Graveleau, C., Abel, E., Shaw, C., Bray, M., Hardin, P., and Young, M. (2005). The intrinsic circadian clock within the cardiomyocyte. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 289:1530–1541. **92**
- Durgan, D. and Young, M. (2008). Linking the cardiomyocyte circadian clock to myocardial metabolism. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 22:115–124. **92**
- Duysens, L. and Ames, J. (1957). Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible region. *Biochim. Biophys. Acta*, 24:19–26. **48**
- 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. **114**
- Ehlers, C. L., Frank, E., and Kupfer, D. J. (1988). Social zeitgebers and biological rhythms. a unified approach to understanding the etiology of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 45:948–952. **114**
- Ekström, P. (2003). Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358:1679–1700. **90**
- Engelmann, W. (2004a). Rhythmen in Strukturen von Organismen. <http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3793>. **1**
- Engelmann, W. (2004b). Wie man eine biologische Uhr stoppen kann: Singularitätspunkt. <http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3xxx>. **1**

- Engelmann, W. (2004c). Wie Pflanzen wachsen und sich bewegen. <http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3777>. 1
- Engelmann, W. (2007). Rhythmen des Lebens - Eine Einführung anhand ausgewählter Themen und Beispiele. <http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3799>. 1
- Engelmann, W. (2008a). Blumenuhren, Zeitgedächtnis und Zeitvergessen. <http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3800>. 1
- Engelmann, W. (2008b). Unsere inneren Uhren - Biologische Zeitmessung bei Menschen und anderen Säugern. <http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3773>. 1
- Engelmann, W. (2009a). Biokalender - Das Jahr im Leben der Pflanzen und Tiere. <http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3768>. 1
- Engelmann, W. (2009b). Fliegende Uhren - die Uhren der Tauf- liege. <http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3795>. 1
- Engelmann, W. (2009c). Uhren, die nach dem Mond gehen. Einfluss des Mondes auf die Erde und ihre Lebewesen. <http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3766>. 1
- Engelmann, W. and Schrempf, M. (1979). Membrane models for circadian rhythms. *Photochem. Photobiol. Reviews*, 5:49–86. 40, 41
- Epperson, C. N., Terman, M., Terman, J. S., Hanusa, B. H., Oren, D. A., Peindl, K. S., and Wisner, K. L. (2004). Randomized clinical trial of bright light therapy for antepartum depression: preliminary findings. *J Clin Psychiatry*, 65:421–425. 114
- 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. 33
- Esseveldt, L., Lehman, M., and Boer, G. (2000). The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Research Reviews*, 33:34–77. 73
- Fahrenbach, J. P., Mejia-Alvarez, R., and Banach, K. (2007). The relevance of non-excitabile cells for cardiac pacemaker function. *The Journal of Physiology*, 585:565–578. 93
- Falcon, J. (1999). Cellular circadian clocks in the pineal. *Progress in Neurobiology*, 58:121–162. 90
- Falcon, J., Gothilf, Y., Coon, S. L., Boeuf, G., and Klein, D. C. (2003). Genetic, temporal and developmental differences between melatonin rhythm generating systems in the teleost fish pineal organ and retina. *Journal of Neuroendocrinology*, 15:378–382. 90
- Fan, Y., Hida, A., Anderson, D., Izumo, M., and Johnson, C. (2007). Cycling of cryptochrome proteins is not necessary for circadian-clock function in mammalian fibroblasts. *Current Biology*, 17:1091–1100. 71

- Fausto, N., Campbell, J., and Riehle, K. (2006). Liver regeneration. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1):S45–53. 114
- Figala, J., Hoffmann, K., and Goldau, G. (1973). Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster *Phodopus sungorus* Pallas. *Oecologia*, 12:89–118. 87
- Fogel, M. and Hastings, J. (1971). A substrate binding protein in the Gonyaulax bioluminescence reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 142:310–321. 25
- Förster, C. and Engelmann, W. (1988). *Thalassomyxa australis* rhythmicity III. Entrainment by combination of different Zeitgeber. *J. Interdisc. Cycle Res.*, 19:275–288. 49
- 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. 87
- Francis, C. and Sargent, M. (1979). Effects of temperature perturbations on circadian conidiation in *Neurospora*. *Plant Physiology*, 64:1000–1004. 55
- Frank, E., Hlastala, S., Ritenour, A., Houck, P., Tu, X. M., Monk, T. H., Mallinger, A. G., and Kupfer, D. J. (1997). Inducing lifestyle regularity in recovering bipolar disorder patients: results from the maintenance therapies in bipolar disorder protocol. *Biol Psychiatry*, 41:1165–1173. 114
- Frank, E., Kupfer, D. J., Thase, M. E., Mallinger, A. G., Swartz, H. A., Fagioli, A. M., Grochocinski, V., Houck, P., Scott, J., Thompson, W., and Monk, T. (2005). Two-year outcomes for interpersonal and social rhythm therapy in individuals with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 62:996–1004. 114
- Fritz, L., Morse, D., and Hastings, J. (1990). 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. 24
- 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. 33
- Froy, O. (2007). The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol*, 28:61–71. 69, 109
- Froy, O., Chapnik, N., and Miskin, R. (2008). The suprachiasmatic nuclei are involved in determining circadian rhythms during restricted feeding. *Neuroscience*, 155:1152–1159. 69
- Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., and Lee, C. (2002). The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, 111:41–50. 105, 106
- Gall, A. J., Todd, W. D., Ray, B., Coleman, C. M., and Blumberg, M. S. (2008). The development of day-night differences in sleep and wakefulness in norway rats and the effect of bilateral enucleation. *J Biol Rhythms*, 23:232–241. 72
- Gallon, J. (1981). The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. *TIBS*, 6:19–23. 17

- Gallon, J. (1992). Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>. *New Phytol.*, 122:571–609. [17](#)
- Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpoux, B., and Klein, D. C. (2005). Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:1222–1227. [90](#)
- Gao, Q. and Horvath, T. L. (2008). Crosstalk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294:E817–E826. [98](#)
- Gardner, G. and Feldman, J. (1981). Temperature compensation of circadian period length in clock mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiology*, 68:1244–1248. [55](#)
- Gauger, M. and Sancar, A. (2005). Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer. *Cancer Research*, 65:6828–6834. [106](#)
- Germain, A. and Kupfer, D. J. (2008). Circadian rhythm disturbances in depression. *Hum Psychopharmacol*, 23:571–585. [113](#)
- Germain, N., Galusca, B., Grouselle, D., Frere, D., Tolle, V., Zizzari, P., Lang, F., Epelbaum, J., and Estour, B. (2008). Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: Constitutional thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*, 34:413–419. [99](#)
- Gibor, A. (1966). *Acetabularia*: A useful giant cell. *Scientific American*, 215:118–124. [37](#)
- Goel, N., Terman, M., and Terman, J. S. (2003). Dimensions of temperament and bright light response in seasonal affective disorder. *Psychiatry Res*, 119:89–97. [114](#)
- Golden, S. S. (2007). Integrating the circadian oscillator into the life of the cyanobacterial cell. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 72:331–338. [7](#), [11](#), [15](#), [16](#)
- Golden, S. S. and Canales, S. R. (2003). Cyanobacterial circadian clocks -timing is everything. *Nature Reviews*, 1:191–199. [11](#), [13](#)
- Golden, S. S., Tsinoemas, N. F., Liu, Y., Kutsuna, S., Lebedeva, N., Andersson, C., Aoki, S., Johnson, C. H., Ishiura, M., and Kondo, T. (1995). The quest for the cyanobacterial circadian clock. *Plant Physiology*, 108 (2 Suppl.):15. [15](#)
- Goodwin, B. (1965). Oscillatory behavior in enzymatic control processes. In Weber, G., editor, *Advances in enzyme regulation*. Pergamon Press, Oxford. [57](#)
- Grandin, L. D., Alloy, L. B., and Abramson, L. Y. (2006). The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation. *Clin Psychol Rev*, 26:679–694. [114](#)
- Green, C. B. and Besharse, J. C. (2004). Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *J Biol Rhythms*, 19(2):91–102. [84](#)
- Green, C. B., Takahashi, J. S., and Bass, J. (2008). The meter of metabolism. *Cell*, 134:728–742. [109](#)
- Grell, K. (1987). Der Formwechsel von *Thalassomyxa australis* (Promycetozoidae)". Movie. [47](#)
- Grell, K. G. (1985). Der Formwechsel des plasmodialen Rhizopoden *Thalassomyxa australis* (Promycetozoidae)". Movie. [47](#)

- somyxa australis n. G., n. Sp. *Protistologica*, 21:215–233. 47
- Gross, I., Hardeland, R., and Wolf, R. (1994). Circadian rhythm of tyrosine aminotransferase activity in *Gonyaulax polyedra*. *Biological Rhythm Research*, 25:51–58. 33
- Grossman, A. R., Croft, M., Gladyshev, V. N., Merchant, S. S., Posewitz, M. C., Prochnik, S., and Spalding, M. H. (2007). Novel metabolism in *Chlamydomonas* through the lens of genomics. *Curr Opin Plant Biol*, 10:190–198. 43
- Grözinger, M., Beersma, D. G. M., Fell, J., and Röschke, J. (2002). Is the nonREM-REM sleep cycle reset by forced awakenings from REM sleep? *Physiol Behav*, 77:341–347. 114
- Grundschober, C., Delaunay, F., Puhlhofer, A., Triqueneaux, G., Laudet, V., Bartfai, T., and Nef, P. (2001). Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276:46751–46758. 69
- Guo, H., Brewer, J. M. K., Champhekar, A., Harris, R. B. S., and Bittman, E. L. (2005). Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:3111–3116. 69
- Guo, H., Brewer, J. M. K., Lehman, M. N., and Bittman, E. L. (2006). Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *J Neurosci*, 26:6406–6412. 69
- Hämmerling, J. (1963). Nucleocytoplasmatic interactions in *Acetabularia* and other cells. *Annual Rev. Plant Physiol.*, 14:65–92. 38
- Hannibal, J. (2006). Roles of pacap-containing retinal ganglion cells in circadian timing. *Int Rev Cytol*, 251:1–39. 84
- Hardeland, R. (1980). Effects of catecholamines on bioluminescence in *Gonyaulax polyedra* (Dinoflagellata). *Comp. Biochem. Physiol.*, 66C:53–58. 35
- Harris, E. (1998). *Introduction to Chlamydomonas*. Springer. 44
- Harris, R. B. (2000). Leptin—much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr*, 20:45–75. 108
- Hartwig and Schweiger (1986). Cellular aspects of circadian rhythms. *J Cell Sciences*, 4 Suppl.:181–200. 40
- Hashimoto, S., Nakamura, K., Honma, S., and Honma, K. I. (1998). Free-running of plasma-melatonin rhythm prior to full manifestation of a non-24 hour sleep-wake syndrome. *Psychiatr. Clin. Neurosc.*, 52:264–265. 106
- Hastings, J. (1959). Unicellular clocks. *Ann. Rev. Microbiol.*, 13:297–312. 20
- Hastings, J. (1960). Biochemical aspects of rhythms: Phase shifting by chemicals. *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biology*, 25:131–140. 21
- Hastings, J. (1994). Biological clocks. *Mitteilungen der Alexander von Humboldt-Stiftung*, 63:17–23. 19
- Hastings, J., Astrachan, L., and Sweeney, B. (1961). A persistent daily rhythm in

- photosynthesis. *J.gen.Physiol.*, 45:69–76. 29, 31
- 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. 20, 22
- Hastings, J. W. (2006). <http://www.mcb.harvard.edu/hastings/dino.html>. 19
- Hastings, M. and Maywood, E. (2000). Circadian clocks in the mammalian brain. *BioEssays*, 22:23–31. 69, 76
- Hastings, M., O'Neill, J. S., and Maywood, E. S. (2007). Circadian clocks: Regulators of endocrine and metabolic rhythms. *Journal of Endocrinology*, 195:187–198. 70
- 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*, 12:127–133. 54
- Haus, E. (2007). Chronobiology in the endocrine system. *Adv Drug Deliv Rev*, 59:985–1014. 70
- Heintzen, C., Loros, J., and Dunlap, J. (2000). VIVID, light adaptation and the circadian clock: The PAS protein VVD defines a feedback loop that represses light input pathways and regulates clock resetting. *Cell*, 3:453–464. 57
- Hellebust, J., Terborgh, J., and Mcleod, G. (1967). The photosynthesis rhythm of *Acetabularia* c. II. Measurements of photoassimilation of carbon dioxide and the activities of enzymes of the reductive pentose cycle. *Biol. Bull.*, 130:670–678. 38
- 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. 29, 30
- Hersoug, L.-G. and Linneberg, A. (2007). The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: Does obesity induce decreased immune tolerance? *Allergy*, 62:1205–1213. 109
- Herzog, E. D., Geusz, M. E., Khalsa, S. B., Straume, M., and Block, G. D. (1997). Circadian rhythms in mouse suprachiasmatic nucleus explants on multielectrode plates. *Brain Res*, 757:285–290. 72
- Hess, B. and Boiteux, A. (1971). Oscillatory phenomena in biochemistry. *Ann.Rev. Biochem.*, 40:237–258. 50
- 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 controlled by two oscillators? *J. Biological Rhythms*, 7:115–123. 27, 28
- Hileman, S. M., Pierroz, D. D., and Flier, J. S. (2000). Leptin, nutrition, and reproduction: Timing is everything. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:804–807. 98
- Hill, J. W., Elmquist, J. K., and Elias, C. F. (2008). Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294:E827–E832. 98
- Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura,

- M., and Todo, T. (2000). Bacterial cryptochrome and photolyase: Characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Research*, 28:2353–2362. 15
- Hochberg, M. and Sargent, M. (1974). Rhythms of enzyme activity associated with circadian conidiation in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 120:1164–1176. 54
- Hoffmann, K. (1973). Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster *Phodopus sungorus* Pallas. *Oecologia*, 12:89–118. 87
- Hoffmann, K. (1981). The role of the pineal gland in the photoperiodic control of seasonal cycles in hamsters. In Follett, B. and Follett, D., editors, *Biological clocks in seasonal reproductive cycles*, pages 237–250. Wright, Bristol. 89
- Holtman, C., Chen, Y., Sandoval, P., Gonzales, A., Nalty, M., Thomas, T., Youderian, P., and Golden, S. (2005). High-throughput functional analysis of the *Synechococcus elongatus* PCC 7942 genome. *DNA Research*, 12:103–115. 16, 17
- Holzberg, D. and Albrecht, U. (2003). The circadian clock: a manager of biochemical processes within the organism. *J Neuroendocrinol*, 15:339–343. 67
- 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. 32
- Homma, K. and Hastings, J. (1988). Cell cycle synchronization of *Gonyaulax polyedra* by filtration: Quantized generation time. *JBR*, 3:49–58. 32
- Homma, K. and Hastings, J. (1989). Cell growth kinetics, division asymmetry and volume control at division in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*: A model of circadian clock control of the cell cycle. *J Cell Sc.*, 92:303–318. 32
- Huang, T.-C. and Pen, S.-Y. (1994). Induction of a circadian rhythm in *Synechococcus* RF-1 while the cells are in a 'suspended state'. *Planta*, 194:436–438. 16
- 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. 74
- Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., and Ishida, N. (2005). A role for glycogen synthase kinase-3 {beta} in the mammalian circadian clock. *Journal of Biological Chemistry*, 280:29397–29402. 113
- Ikonomov, O. C., Stoynev, A. G., and Shisheva, A. C. (1998). Integrative coordination of circadian mammalian diversity: Neuronal networks and peripheral clocks. *Prog Neurobiol*, 54:87–97. 94
- Illnerova, H. and Vanecek, J. (1982). Two-oscillator structure of the pacemaker controlling the circadian rhythm of N-acetyltransferase in the rat pineal gland. *Journal of Comparative Physiology*, A145:539–548. 73
- Inagaki, N., Honma, S., Ono, D., Tanahashi, Y., and Honma, K. I. (2007). Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:7664–7669. 71, 73, 74

- Inouye, C., Okamoto, K., Ishiura, M., and Kondo, T. (1998). The action spectrum of phase shift by light signal in the circadian rhythm in cyanobacterium. *Plant Cell Physiol*, 39:82. **15**
- 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. **11, 16**
- Iuvone, P., Tosini, G., Pozdeyev, N., Haque, R., Klein, D., and Chaurasia, S. (2005). Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24:433–456. **90**
- Ivleva, N. B., Bramlett, M. R., Lindahl, P. A., and Golden, S. S. (2005). LdpA: A component of the circadian clock senses redox state of the cell. *The EMBO Journal*, 24:1202–1210. **11, 15**
- Iwasaki, H. and Dunlap, J. (2000). Microbial circadian oscillatory system in *Neurospora crassa* and *Synechococcus*: Models for cell clocks. *Current Opinion in Microbiol.*, 3:189–196. **60**
- Iwasaki, H. and Kondo, T. (2004). Circadian timing mechanism in the prokaryotic clock system of cyanobacteria. *Journal of Biological Rhythms*, 19:436–444. **11**
- Iwasaki, H., Williams, S., Kitayama, Y., Ishiura, M., Golden, S., and Kondo, T. (2000). A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in Cyanobacteria. *Cell*, 101:223–233. **14**
- Jacklet, J. (1981). Circadian timing by endogenous oscillators in the nervous system: Toward cellular mechanisms. *Biol. Bull.*, 160:199–227. **26**
- Jacklet, J. W. (1969). Electrophysiological organization of the eye of *Aplysia*. *J General Physiology*, 53:21–42. **82**
- Jagota, A., de la Iglesia, H. O., and Schwartz, W. J. (2000). Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nature Neuroscience*, 3:372–376. **73**
- James, F. (2007). Expression of clock genes in human peripheral blood mononuclear cells throughout the sleep/wake and circadian cycles. *Chronobiology International*, 24(6):1009–1034. **93**
- Jean, Y., Bagayogo, I., and Dreyfus, C. (2008). *Release of Trophic Factors and Immune Molecules from Astrocytes*. Springer. **80**
- Johnson, C., Golden, S., and Kondo, T. (1998). Adaptive significance of circadian programs in cyanobacteria. *Trends in Microbiology*, 6:407–410. **17, 18**
- 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. **24**
- 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. **25, 33**
- Joyce, P. R., Porter, R. J., Mulder, R. T., Luty, S. E., McKenzie, J. M., Miller, A. L.,

- and Kennedy, M. A. (2005). Reversed diurnal variation in depression: Associations with a differential antidepressant response, tryptophan: Large neutral amino acid ratio and serotonin transporter polymorphisms. *Psychol Med*, 35:511–517. **114**
- Kallies, A., Gebauer, G., and Rensing, L. (1998). Heat shock effects on second messenger systems of *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.*, 170:191–200. **63**
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Miyajima, N., Hiroswawa, M., Sazuka, T., Sugiura, M., and Tabata, S. (1996). Genome sequencing project of a cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Plant Cell Physiol*, 37:1–153. **3, 15**
- Kaplowitz, P. B. (2008). Link between body fat and the timing of puberty. *Pediatrics*, 121 Suppl 3:S208–S217. **98**
- Karakashian, M. W. and Schweiger, H. G. (1976). Circadian properties of the rhythmic system in individual nucleated and enucleated cells of *Acetabularia mediterranea*. *Experimental. Cell Research*, 97:366–377. **38, 40**
- Kateriya, S., Nagel, G., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2004). 'vision' in single-celled algae. *News Physiol Sci*, 19:133–137. **43**
- Kiess, W., Petzold, S., Töpfer, M., Garten, A., Blüher, S., Kapellen, T., Körner, A., and Kratzsch, J. (2008). Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22:135–153. **108**
- 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. **33**
- Kim, Y., Dong, G., Carruthers Jr, C., Golden, S., and Liwang, A. (2008). The day/night switch in KaiC, a central oscillator component of the circadian clock of Cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci US A*, 105:12825–30. **14**
- Kippert, F. and Lloyd, D. (1995). Rhythmic CO<sub>2</sub> formation in fermenting and in respiring *Saccharomyces pombe* cultures. *Microbiol.*, 141:S888. **5, 7, 51, 52, 53**
- Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Terauchi, K., and Kondo, T. (2008). Dual KaiC-based oscillations constitute the circadian system of Cyanobacteria. *Genes & Development*, 22:1513. **11**
- Klein, D. (2004). The 2004 Aschoff/Pittendrigh lecture: theory of the origin of the pineal gland—a tale of conflict and resolution. *Journal of Biological Rhythms*, 19:264. **90**
- Klein, D. (2006). Evolution of the vertebrate pineal gland: the AANAT hypothesis. *Chronobiology International*, 23:5–20. **90**
- Klein, D. C. (1985). Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp*, 117:38–56. **90**
- Klein, D. C., Baler, R., Roseboom, P. H., Weller, J. L., Bernard, M., Gastel, J. A., Zatz, M., Iuvone, P. M., Begáy, V., and Falcón, J. (1998). The molecular basis of the pineal melatonin rhythm: Regulation of serotonin N-acetylation. In *Handbook of behavioral state control: cellular and molecular mechanisms*. Boca Raton: CRC Press. **90**

- Klein, D. C. and Krieger, D. T., editors (1979). *Circadian rhythms in the pineal gland*. Raven Press, New York. 90
- Klerman, E. B. (2005). Clinical aspects of human circadian rhythms. *J Biol Rhythms*, 20:375–386. 105, 107
- Klisch, C., Mahr, S., and Meissl, H. (2006). Circadian activity rhythms and phase-shifting of cultured neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int*, 23:181–190. 72
- Knoetzel, J. and Rensing, L. (1990). 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. 29
- Koenigsberg, H. W. (1984). Indications for hospitalization in the treatment of borderline patients. *Psychiatr Q*, 56:247–258. 113
- Kohsaka, A. and Bass, J. (2007). A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 18:4–11. 2, 72
- 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. 7, 11
- Kondo, T., Mori, T., Lebedeva, N., Aoki, S., Ishiura, M., and Golden, S. (1997). Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria. *Science*, 275:224–227. 14
- 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. 7, 8, 10, 11
- Kondo, T., Tsinoemas, N., Golden, S., Johnson, C., Kutsuna, S., and Ishiura, M. (1994). Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science*, 266:1233–1236. 12
- Koop, H.-U., Schmid, R., Heunert, H.-H., and Milthaler, B. (1978). Chloroplast migration: A new rhythm in *Acetabularia*. *Protoplasma*, 97:301–310. 38
- Kornmann, B. (2007). The central circadian clock and peripheral clocks: Decentralization and hierarchical control. *Med Sci (Paris)*, 23:349–350. 114
- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J., and Schibler, U. (2007). System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol*, 5:e34. 114
- Kriegsfeld, L. and Silver, R. (2006). The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Hormones and Behavior*, 49:557–574. 70
- Kripke, D. F., Risch, S. C., and Janowsky, D. (1983). Bright white light alleviates depression. *Psychiatry Res*, 10:105–12. 114
- Kumar, A., Munehiko, A., and Makoto, S. (1999). Light-dependent and rhythmic psbA transcripts in homologous/heterologous cyanobacterial cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 255:47–53. 15

- Kumar, V., Juss, T. S., and Follett, B. K. (1993). Melatonin secretion in quail provides a seasonal calendar but not one used for photoperiodic time measurement. In Touitou, Y., Arendt, J., and Pévet, P., editors, *Melatonin and the Pineal Gland-From Basic Science to Clinical Application*, pages 163–168. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 89
- Kurumiya, S. and Kawamura, H. (1988). Circadian oscillation of the multiple unit activity in the guinea pig suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol [A]*, 162:301–308. 69
- Kurumiya, S. and Kawamura, H. (1991). Damped oscillation of the lateral hypothalamic multineuronal activity synchronized to daily feeding schedules in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *J Biol Rhythms*, 6:115–127. 69
- Lakin-Thomas, P. (2000). Circadian rhythms: new functions for old clock genes. *Trends in Genetics*, 16:135–142. 60
- Lakin-Thomas, P. L. (1998). Choline depletion, frq mutations, and temperature compensation of the circadian rhythm in *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Rhythms*, 13:268–277. 62
- Lakin-Thomas, P. L., Gooch, V. D., and Ramsdale, M. (2001). Rhythms of differentiation and diacylglycerol in *Neurospora*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356:1711–1715. 53
- Lam, R. W., Carter, D., Misri, S., Kuan, A. J., Yatham, L. N., and Zis, A. P. (1999). A controlled study of light therapy in women with late luteal phase dysphoric disorder. *Psychiatry Res*, 86:185–192. 114
- Lambert, G., Reid, C., Kaye, D., Jennings, G., and Esler, M. (2003). Increased suicide rate in the middle-aged and its association with hours of sunlight. *Am J Psychiatry*, 160:793–795. 113
- Land, M. and Fernald, R. (1992). The evolution of eyes. *Annual Review of Neuroscience*, 15:1–29. 84
- Lapointe, M. and Morse, D. (2008). Re-assessing the role of a 3'-UTR-binding translational inhibitor in regulation of circadian bioluminescence rhythm in the dinoflagellate *Gonyaulax*. *Biological Chemistry*, 389:13–19. 20
- Laposky, A. D., Bass, J., Kohsaka, A., and Turek, F. W. (2008). Sleep and circadian rhythms: Key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Lett*, 582:142–151. 105, 112
- Larkin, E. K. (2006). 108 candidate genes for sleep disordered breathing. *Sleep Medicine*, 7:3–3. 113
- Larkin, E. K., Elston, R. C., Patel, S. R., Tishler, P. V., Palmer, L. J., Jenny, N. S., and Redline, S. (2005). Linkage of serum leptin levels in families with sleep apnea. *International Journal of Obesity*, 29:260–267. 113
- Lee, J. H., Chan, J. L., Yiannakouris, N., Kontogianni, M., Estrada, E., Seip, R., Orlova, C., and Mantzoros, C. S. (2003). Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88:4848–4856. 99

- Lee, K., Loros, J., and Dunlap, J. (2000). Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science*, 289:107–110. 57
- 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. 70
- Lemmer, B. (1999). Chronopharmacology and its impact on antihypertensive treatment. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*, 24(3):71–80. 113
- Lengeler, J. W. and Drews, G. (1998). *Biology of the Prokaryotes*. Georg Thieme. 3
- Levitan, R. D. (2007). The chronobiology and neurobiology of winter seasonal affective disorder. *Dialogues Clin Neurosci*, 9:315–324. 113
- 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. 89
- 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. 114
- Lewy, A. J. (2007). Melatonin and human chronobiology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 72:623–636. 114
- Lin, R., Chou, H., and Huang, T. (1999). Priority of light-dark entrainment over temperature in setting the circadian rhythms of the prokaryote *Synechococcus* RF-1. *Planta*, 209:202–206. 15
- Linden, H., Ballario, P., Arpaia, G., and Macino, G. (1999). Seeing the light: news in *Neurospora* blue light signal transduction. *Adv Genet*, 41:35–54. 59
- Lindgren, K. M. (1994). *Characterization of ccg-1, a clock-controlled gene in Neurospora crassa*. PhD thesis, Dartmouth College, USA. 54
- Liu, Y., Garceau, N. Y., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (1997). Thermally regulated translational control of FRQ mediates aspects of temperature responses in the *Neurospora* circadian clock. *Cell*, 89:477–486. 56, 60
- Liu, Y., Mellow, M., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (1998). How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science*, 281:825–829. 54, 59
- Lloyd, D. and Gilbert, D. (1998). Temporal organization of the cell division cycle in eukaryotic microbes. In Cad-dick, M., Baumberg, S., Hodgson, D., and Phillips-Jones, M., editors, *Microbial responses to light and time*, volume 56 of *Soc. Gen. Microbiol. Symp.*, pages 251–278. Cambridge University Press. 33
- Lloyd, D. and Kippert, F. (1987). Temperature-compensated ultradian clocks time protozoan cell cycles. *Chronobiologia*, 14:197–198. 51
- Lloyd, D. and Rossi, E. (1992). *Ultradian rhythms in life processes*. Springer London, Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest. 51
- Lloyd, D. and Volkov, E. (1990). Quantized cell cycle times: Interaction between a

- relaxation oscillator and ultradian clock pulses. *BioSystems*, 23:305–310. **33**
- Locket, N. A. (1999). *Vertebrate photoreceptors*. Kluwer Academic Pub. **84**
- Loros, J. (1995). The molecular basis of the *Neurospora* clock. *Semin. Neurosci.*, 7:3–13. **59**
- Loros, J. and Dunlap, J. (2001). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. *Ann. Rev. Physiol.*, 63:757–794. **63, 64**
- 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. **60**
- Loros, J., Richman, A., and Feldman, J. (1986). A recessive circadian clock mutant at the *frq* locus in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 114:1095–1110. **60**
- Loucks, A. B. (2007). Energy availability and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 14:470–474. **108**
- Loving, R. T., Kripke, D. F., and Shuchter, S. R. (2002). Bright light augments antidepressant effects of medication and wake therapy. *Depress Anxiety*, 16:1–3. **114**
- Lowrey, P. L. and Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5:407–441. **105, 106**
- Lu, J., Zhang, Y. H., Chou, T. C., Gaus, S. E., Elmquist, J. K., Shiromani, P., and Saper, C. B. (2001). Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J Neurosci*, 21:4864–4874. **78**
- Mackey, S. R. and Golden, S. S. (2007). Winding up the cyanobacterial circadian clock. *Trends Microbiol*, 15(9):381–388. **3**
- 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. **33**
- Maronde, E., Pfeffer, M., Glass, Y., and Stehle, J. (2007). Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the Syrian hamster (*mesocricetus auratus*) adapts to prevailing photoperiod. *Journal of Pineal Research*, 43:16–24. **114**
- Matsuo, T., Okamoto, K., Onai, K., Niwa, Y., Shimogawara, K., and Ishiura, M. (2008). A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes & Development*, 22:918–930. **43**
- Matsuo, T., Onai, K., Okamoto, K., Minagawa, J., and Ishiura, M. (2006). Real-time monitoring of chloroplast gene expression by a luciferase reporter: Evidence for nuclear regulation of chloroplast circadian period. *Molecular and Cellular Biology*, 26:863–870. **43**
- Matsuo, T., Onai, K., Onai, K., Okamoto, K., Okamoto, K., Okamoto, K., Minagawa, J. U. N., Ishiura, M., Ishiura, M., and Ishiura, M. (2005). Nuclear regulation of circadian gene expression in the chloroplast. *Genes & Genet Syst*, 80:487. **43**
- Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S.; Emi, A., Shimoda, F., and Okamura, H.

- (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, 302:255–259. 100
- Maywood, E. S., O'Neill, J. S., Chesham, J. E., and Hastings, M. H. (2007a). Minireview: The circadian clockwork of the suprachiasmatic nuclei analysis of a cellular oscillator that drives endocrine rhythms. *Endocrinology*, 148:5624. 69
- Maywood, E. S., O'Neill, J. S., Reddy, A. B., Chesham, J. E., Prosser, H. M., Kyriacou, C. P., Godinho, S. I. H., Nolan, P. M., and Hastings, M. H. (2007b). Genetic and molecular analysis of the central and peripheral circadian clockwork of mice. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72:85–94. 69
- Meijer, J. and Schwartz, W. (2003). In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 18:235–249. 73
- Menaker, M., Moreira, L., and Tosini, G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30:305–313. 84
- Mendoza, J. (2007). Circadian clocks: setting time by food. *Journal of Neuroendocrinology*, 19:127–137. 114
- Mendoza, J., Clesse, D., Pévet, P., and Challet, E. (2008a). High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J Physiol*, 586:5901–5910. 111
- Mendoza, J., Drevet, K., Pévet, P., and Challet, E. (2008b). Daily meal timing is not necessary for resetting the main circadian clock by calorie restriction. *J Neuroendocrinol*, 20:251–260. 111
- Mergenhagen, D. and Schweiger, H. (1974). Circadian rhythmicity: Does intercellular synchronization occur in *Acetabularia*? *Plant Science letters*, 3:387–389. 42
- Mergenhagen, D. and Schweiger, H. (1975). 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–. 40
- Merrow, M., Boesl, C., Ricken, J., Messerschmitt, M., Goedel, M., and Roenneberg, T. (2006). Entrainment of the *Neurospora* circadian clock. *Chronobiol Int*, 23:71–80. 43
- Michel, S., Geusz, M., Zaritsky, J., and Block, G. (1993). Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science*, 259:239–241. 82
- Mihalcescu, I., Hsing, W., and Leibler, S. (2004). Resilient circadian oscillator revealed in individual Cyanobacteria. *Nature*, 430:81–85. 7
- Min, H., Liu, Y., Johnson, C. H., and Golden, S. S. (2004). Phase determination of circadian gene expression in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Journal of Biological Rhythms*, 19:103–112. 14
- Mircea, C. N., Lujan, M. E., and Pierson, R. A. (2007). Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *J Obstet Gynaecol Can*, 29:887–902. 98
- Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S., and Arai, T. (1986). Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nat.*, 323:720–722. 4, 5

- Mittag, M. (1998). Molecular mechanisms of clock-controlled proteins in phytoflagellates. *Protist*, 149:101–107. [25](#)
- Mittag, M., Kiaulehn, S., and Johnson, C. (2005). The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? *Plant Physiology*, 137:399–409. [43](#)
- Mittag, M. and Wagner, V. (2003). The circadian clock of the unicellular eukaryotic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biological chemistry*, 384:689–695. [43](#)
- 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. [87](#), [90](#)
- 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. [6](#), [14](#)
- Mori, T., Saveliev, S., Xu, Y., Stafford, W., Cox, M., Inman, R., and Johnson, C. (2002). Circadian clock protein KaiC forms ATP-dependent hexameric rings and binds DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:17203–17208. [14](#)
- Mörike, K. and Mergenthaler, W. (1959). *Biologie des Menschen*. Quelle und Meyer, Heidelberg. [85](#), [86](#)
- Morin, L. P. and Allen, C. N. (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev*, 51:1–60. [84](#)
- Morse, D., Fritz, L., and Hastings, J. (1990). What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. *TIBS*, 15:262–265. [20](#), [23](#), [27](#)
- Morse, D., Hastings, J., and Roenneberg, T. (1994). Different phase responses of two circadian oscillators in *Gonyaulax*. *J. Biol. Rhythms*, 9:263–274. [27](#), [29](#)
- 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. [28](#)
- 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. [24](#)
- Murray, J. D. (1993). *Mathematical Biology, vol. 18*. Springer Biomathematics Texts. [57](#)
- Nagel, G., Szellas, T., Kateriya, S., Adeishvili, N., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2005). Channelrhodopsins: Directly light-gated cation channels. *Biochem Soc Trans*, 33:863–866. [43](#)
- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., and Schibler, U. (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*, 119:693–705. [79](#), [92](#), [105](#), [106](#)
- Nakahira, Y., Katayama, M., Miyashita, H., Kutsuna, S., Iwasaki, H., Oyama, T., and Kondo, T. (2004). Global gene repression by kaic as a master process of prokaryotic circadian system. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences*, 101:881–885. 14
- Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., and Oyama, T. and Kondo, T. (2005). Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial kaiC phosphorylation in vitro. *Science*, 308:414–415. 11
- 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. 24
- Nayak, S. K., Jegla, T., and Panda, S. (2007). Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. *Cell Mol Life Sci*, 64:144–154. 87
- Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus: a thrift genotype rendered detrimental by progress? *Am J Hum Genet*, 14:353–362. 111
- Newman, G. and Hospod, F. (1986). Rhythm of suprachiasmatic nucleus 2-deoxyglucose uptake in vitro. *Brain Res.*, 381:345–350. 73
- Nikaido, S. S. and Johnson, C. H. (2000). Daily and circadian variation in survival from ultraviolet radiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photochemistry and Photobiology*, 71:758–765. 43
- Nishiwaki, T., Iwasaki, H., Ishiura, M., and Kondo, T. (2000). Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:495–499. 14
- Njus, D., Gooch, D., and Hastings, J. (1981). Precision of the *Gonyaulax* circadian clock. *Cell Biophys.*, 3:223–231. 20
- Nomura, K., Castanon-Cervantes, O., Davidson, A., and Fukuhara, C. (2008). Selective serotonin reuptake inhibitors and raft inhibitors shorten the period of period1-driven circadian bioluminescence rhythms in rat-1 fibroblasts. *Life Sciences*, 82:1169–1174. 92
- Ogden, E. J. D. and Moskowitz, H. (2004). Effects of alcohol and other drugs on driver performance. *Traffic Inj Prev*, 5:185–198. 112
- Oishi, K., Amagai, N., Shirai, H., Kadota, K., Ohkura, N., and Ishida, N. (2005). Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Research*, 12:191–202. 114
- Oldenhof, H., Zachleder, V., and Ende, H. (2006). Blue- and red-light regulation of the cell cycle in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 41:313–320. 43
- Ortega-Calvo, J. J. and Stal, L. J. (1991). Diazotrophic growth of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* sp. PCC 6909 in continuous culture. *Journal of general microbiology*, 137:1789–1797. 17
- Oster, H., Maronde, E., and Albrecht, U. (2002). The circadian clock as a molecular calendar. *Chronobiology International*, 19:507–516. 82
- Otway, D., Frost, G., and Johnston, J. (2008). Identification of a circadian clock within adipocyte cells. *Endocrine Abstracts*, 15:P126. 99
- Page, T. L. (2001). *Circadian systems of invertebrates*, volume 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 82

- Peters, J. L. (2005). *Astrocytes and the circadian clock: Roles for calcium, light, and melatonin*. PhD thesis, Texas University. **81**
- Peters, J. L., Earnest, B. J., Tjalkens, R. B., Cassone, V. M., and Zoran, M. J. (2005). Modulation of intercellular calcium signaling by melatonin in avian and mammalian astrocytes is brain region-specific. *J Comp Neurol*, 493:370–380. **82**
- Pflug, B. (1976). The effect of sleep deprivation on depressed patients. *Acta Psychiatr Scand*, 53:148–158. **114**
- Piper, A., J. and Grunstein, R. R. (2007). Current perspectives on the obesity hypoventilation syndrome. *Curr Opin Pulm Med*, 13:490–496. **108**
- Pittendrigh, C. S. and Daan, S. A. (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. **73**
- Plante, G. E. (2006). Sleep and vascular disorders. *Metabolism*, 55(10 Suppl 2):S45–S49. **112**
- Prolo, L. M., Takahashi, J. S., and Herzog, E. D. (2005). Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 25:404–408. **81**
- Provencio, I., Cooper, H., and Foster, R. (1998). Retinal projection in mice with inherited retinal degeneration: Implication for circadian photoentrainment. *J. Neurosci.*, 395:417–439. **84**
- Ralph, M., Joysner, A., and Lehman, M. (1993). Culture and transplantation of the mammalian circadian pacemaker. *Journal of Biological Rhythms*, 8:S83–S87. **71**
- 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. **33, 34**
- Reddy, A., Karp, N., Maywood, E., Sarge, E., Deery, M., O'Neill, J., Wong, G., Chesham, J., Odell, M., and Lilley, K. (2006). Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Current Biology*, 16:1107–1115. **100**
- Reddy, A. and Maywood, E. (2007). Circadian rhythms: Per2bations in the liver clock. *Current Biology*, 17:292–294. **114**
- Reddy, A., Wong, G., O'Neill, J., Maywood, E., and Hastings, M. (2005). Circadian clocks: neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 574:76–91. **100**
- Remè, C. E., Wirz-Justice, A., and Terman, M. (1991). The visual input stage of the mammalian circadian pacemaking system: I. Is there a clock in the mammalian eye? *J Biol Rhythms*, 6:5–29. **84**
- Rensing, L. (1993). *Oscillations and morphogenesis*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong. **55**
- Reuss, S. (2003). The clock in the brain: Anatomy of the mammalian circadian timing system. In Peschke, E., editor, *Endokrinologie*, pages 9–48. Abhandlungen der Saechsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse. **73**
- 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. [83](#)
- Roberts, R. E., Shema, S. J., Kaplan, G. A., and Strawbridge, W. J. (2000). Sleep complaints and depression in an aging cohort: A prospective perspective. *Am J Psychiatry*, 157:81–88. [113](#)
- Roenneberg, T. and Carpenter, E. (1993). Daily rhythm of O<sub>2</sub>-evolution in the cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii* under natural and constant conditions. *Marine Biol.*, 117:693–697. [17](#)
- Roenneberg, T., Colfax, G., and Hastings, J. (1989). A circadian rhythm of population behavior in *Gonyaulax polyedra*. *JBR*, 4:201–216. [28](#), [29](#)
- Roenneberg, T. and Merrow, M. (2001). Seasonality and photoperiodism in fungi. *Journal of Biological Rhythms*, 16:403–414. [63](#)
- Roenneberg, T. and Morse, D. (1993). Two circadian oscillators in one cell. *Nature*, 362:362–364. [27](#), [28](#)
- 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. [35](#)
- Roenneberg, T., Nakamura, H., and Hastings, J. (1988). Creatine accelerates the circadian clock in a unicellular alga. *Nat.*, 334:432–434. [28](#), [35](#)
- Roenneberg, T. and Rehman, J. (1998). Survival in a temporal world - the circadian program of the marine unicell *Gonyaulax*. In Chaddick, M. X., Baumberg, S., Hodgson, D. A., and Phillips-Jones, M. K., editors, *Microbial Responses to Light and Time*, pages 237–250. University Press Cambridge. [20](#), [60](#)
- Roenneberg, T. and Taylor, W. (1994). Light-induced phase responses in *Gonyaulax* are drastically altered by creatine. *Journal of Biological Rhythms*, 9:1–12. [35](#)
- Rosenthal, N. E., Joseph-Vanderpool, J. R., Levendosky, A. A., Johnston, S. H., Allen, R., Kelly, K. A., Souetre, E., Schultz, P. M., and Starz, K. E. (1990). Phase-shifting effects of bright morning light as treatment for delayed sleep phase syndrome. *Sleep*, 13:354–361. [114](#)
- Rougemont, J. and Naef, F. (2007). Stochastic phase oscillators and circadian bioluminescence recordings. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 72:405–411. [79](#)
- Ruan, G. X., Zhang, D. Q., Zhou, T., Yamazaki, S., and McMahon, D. G. (2006). Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 20:9703–9708. [84](#)
- Ruby, N. F. (2003). Hibernation: when good clocks go cold. *J Biol Rhythms*, 18:275–286. [70](#)
- Ruby, N. F., Dark, J., Burns, D. E., Heller, H. C., and Zucker, I. (2002). The suprachiasmatic nucleus is essential for circadian body temperature rhythms in hibernating ground squirrels. *J Neurosci*, 22:357–364. [70](#)
- 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. [57](#)

- Rupprecht, R., Baghai, T., and Möller, H. (2004). Neuentwicklungen in der Pharmakotherapie der Depression. *Der Nervenarzt*, 75:273–280. **114**
- Sakurai, T. (2006). Roles of orexins and orexin receptors in central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *Current Drug Targets-CNS and Neurological Disorders*, 5:313. **108**
- 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. **29, 30**
- San, L. and Arranz, B. (2008). Agomelatine: a novel mechanism of antidepressant action involving the melatonergic and the serotonergic system. *Eur Psychiatry*, 23:396–402. **114**
- Saper, C. B., Cano, G., and Scammell, T. E. (2005). Homeostatic, circadian, and emotional regulation of sleep. *J Comp Neurol*, 493:92–98. **113**
- Scemes, E. and Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *Glia*, 54:716. **81**
- Schibler, U., Ripperger, J., and Brown, S. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*, 18:250–260. **67**
- Schmid, R. and Koop, H. (1983). Properties of the chloroplast movement during the circadian chloroplast migration in *Acetabularia mediterranea*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 112:351–357. **41**
- Schmidt, M., Gessner, G., Luff, M., Heiland, I., Wagner, V., Kaminski, M., Geimer, S., Eitzinger, N., Reissenweber, T., Voytsekh, O., et al. (2006). Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements. *The Plant Cell*, 18:1908. **44**
- Schmitz, O., Katayama, M., Williams, S., Kondo, T., Golden, S., and xx, x. (2000). CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science*, 289:765–768. **15**
- Scholübbbers, H., Taylor, W., and Rensing, L. (1984). Are membrane properties essential for the circadian rhythm of *Gonyaulax*? *Am.J.Physiol.*, 247:R250–256. **35**
- Schou, M. (2000). [50 years lithium treatment]. *Encephale*, 26:1–6. **114**
- 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. **26**
- Schulz, R., Pilatus, U., and Rensing, L. (1986). On the role of energy metabolism in *Neurospora* circadian clock function. *Chronobiol. Intern.*, 2:223–233. **63**
- Schussnig, B. (1954). *Grundriss der Proto-phytologie*. VEB Gustav Fischer, Jena. **19**
- Schwartz, W. and Gainer, H. (1977). Suprachiasmatic nucleus: Use of <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science*, 197:1089–1091. **72**
- Schweiger (1984). Auf der Suche nach dem molekularen Mechanismus der circadianen Uhr. *Mannheimer Forum, Boehringer, Mannheim*, 84/85:115–172. **39, 41**
- Schweiger, E., Wallraff, H., and Schweiger, H. (1964). Endogenous circadian rhythm in cytoplasm of *Acetabularia*

- ria: Influence of the nucleus. *Science*, 146:658–659. 38, 39, 41
- Schweiger, H. (1977). Circadian rhythms in unicellular organisms: An endeavor to explain the molecular mechanism. *Int. Rev. Cytol.*, 51:315–342. 26, 38
- 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, editors, *Polarographic oxygen sensors*, chapter II.7, pages 190–194. Springer Berlin, Heidelberg. 42
- Schweiger, H. and Schweiger, M. (1977). Circadian rhythms in unicellular organisms: an endeavor to explain the molecular mechanism. *Int Rev Cytol*, 51:315–342. 38
- Schweiger, H. G., Hartwig, R., and Schweiger, M. (1986). Cellular aspects of circadian rhythms. *Journal of Cell Science*, 20:181–200. 42
- Scott, E. M. and Grant, P. J. (2006). Neel revisited: The adipocyte, seasonality and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 49:1462–1466. 109, 111
- Sernagor, E. (2005). Retinal development: second sight comes first. *Curr Biol*, 15:R556–R559. 87
- Serretti, A., Benedetti, F., Mandelli, L., Lorenzi, C., Pirovano, A., Colombo, C., and Smeraldi, E. (2003). Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and clock gene polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 121B:35–38. 114
- Serretti, A., Cusin, C., Benedetti, F., Mandelli, L., Pirovano, A., Zanardi, R., Colombo, C., and Smeraldi, E. (2005). Insomnia improvement during antidepressant treatment and clock gene polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 137B:36–39. 114
- Sgarbossa, A., Checcucci, G., and Lenci, F. (2002). Photoreception and photomovements of microorganisms. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1:459–467. 43
- Sharpley, A. L. and Cowen, P. J. (1995). Effect of pharmacologic treatments on the sleep of depressed patients. *Biol Psychiatry*, 37:85–98. 114
- Shibata, S. (2004). Neural regulation of the hepatic circadian rhythm. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 280:901–909. 101
- Shibata, S. and Moore, R. Y. (1993). Neuropeptide y and optic chiasm stimulation affect suprachiasmatic nucleus circadian function in vitro. *Brain Res*, 615:95–100. 74
- 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. 75
- 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. 71
- Silyn-Roberts, H. and Engelmann, W. (1986). *Thalassomyxa australis*: A model

- organism for the evolution of circadian rhythms? *Endocyt. C.Res.*, 3:239–242. 48
- Silyn-Roberts, H., Engelmann, W., and Grell, K. (1986). Thalassomyxa australis rhythmicity I. Temperature dependence. *Interdisc. Cycle Res.*, 17:181–187. 47, 50
- Simonneaux, V. and Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews*, 55:325–395. 74
- Smietanko, A., Stader, L., Förster, C., and Engelmann, W. (1988). Thalassomyxa australis rhythmicity II. No entrainment by light-dark-cycles and temperature cycles? *J. Interdisc. Cycle Res.*, 19:235–240. 47
- Smith, R. and Williams, S. (2006). Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(22):8564–8569. 15
- Sollars, P., Kimble, D., and Pickard, G. (1995). Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic heterografts. *J. Neurosciences*, 15:2109–2122. 70
- Spanagel, R., Pendyala, G., Abarca, C., Zghoul, T., Sanchis-Segura, C., Magnone, M., Lascorz, J., Depner, M., Holzberg, D., Soyka, M., Schreiber, S., Matsuda, F., Lathrop, M., Schumann, G., and Albrecht, U. (2005a). The clock gene *per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nat Med*, 11:35–42. 105, 112
- Spanagel, R., Rosenwasser, A. M., Schumann, G., and Sarkar, D. K. (2005b). Alcohol consumption and the body's biological clock. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29:1550. 112
- Springer, M. (1993). Genetic control of fungal differentiation: The three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *BioEssays*, 15:365–374. 55
- Stal, L. and Krumbein, M. (1985a). Nitrogenase activity in the non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. grown under alternating light-dark cycles. *Arch. Microbiol.*, 143:67–71. 3
- Stal, L. and Krumbein, M. (1985b). Oxygen protection of nitrogenase in the aerobically nitrogen fixing non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Arch. Microbiol.*, 143:72–76. 4
- Steinlechner, R. and Heldmaier, G. (1989). Photoperiodic and thermal regulation in vertebrate body temperature rhythms and thermogenetic acclimation. *JBR*, 4:251–265. 87
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sasaki, Y., and Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, 291:490–493. 69
- Storch, K., Paz, C., Signorovitch, J., Raviola, E., Pawlyk, B., Li, T., and Weitz, C. (2007). Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: Importance for retinal processing of visual information. *Cell*, 130:730–741. 67
- Sulzman, F., Gooch, D., Homma, K., and Hastings, J. (1982). Cellular autonomy of the *Gonyaulax* circadian clock. *Cell Biophysics*, 4:97–103. 20

- Suzuki, L. and Johnson, C. (2002). Photoperiodic control of germination in the unicell *Chlamydomonas*. *Naturwissenschaften*, 89:214–220. 44, 45
- Sweeney, B. (1960). The photosynthetic rhythm in single cells of *Gonyaulax polyedra*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biology*, 25:140–148. 31, 32
- Sweeney, B. (1974). 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. 33
- Sweeney, B. (1981). The circadian rhythms in bioluminescence, photosynthesis and organellar movements in the large dinoflagellate, *Pyrocystis fusiformis*. In Schweiger, H., editor, *International Cell Biology 1980-1981*, pages 807–814. Springer, Berlin, Heidelberg. 31, 35
- Sweeney, B. (1984). Circadian rhythmicity in dinoflagellates. In Spector, editor, *Dinoflagellates*, pages 343–364. Ac. Press NY. 20, 31
- Sweeney, B. and Borgese, A. (1989). A circadian rhythm in cell division in a prokaryote, the cyanobacterium *Synechococcus* WH7803. *J. Physiol.*, 25:183–186. 11
- Sweeney, B. and Hastings, J. (1958). Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra*. *J. Protozoology*, 5:217–224. 31
- Sweeney, B. and Hastings, J. (1960). Effects of temperature upon diurnal rhythms. *Cold Spring Harbor Symp.*, 25:87–104. 20
- Sweeney, B. and Haxo, F. (1961). Persistence of a photosynthetic rhythm in enucleated acetabularia. *Science*, 134:1361–1363. 38
- 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. 31
- 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. 42
- Sweeney, B. M. and Herz, J. M. (1977). Evidence that membranes play an important role in circadian rhythms. In *Proc. XII Int. Conf. Int. Soc. Chronobiol.*, pages 751–761. 33
- 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. 33
- Taylor, W. and Hastings, J. (1979). Aldehydes phase shift the *Gonyaulax polyedra* clock. *J. comp. Physiol.*, 130:359–362. 35
- Taylor, W., Krasnow, R., Dunlap, J. C., Broda, H., and Hastings, J. W. (1982). Critical pulses of anisomycin drive the circadian oscillator in *Gonyaulax* towards its singularity. *JCP*, 148:11–25. 26
- Teikari, P. (2006). *Biological effects of light*. PhD thesis, Helsinki University of Technology. 71, 77
- Tena-Sempere, M. (2008a). Ghrelin and reproduction: Ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitam Horm*, 77:285–300. 98

- Tena-Sempere, M. (2008b). Ghrelin as a pleiotropic modulator of gonadal function and reproduction. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 4:666–674. 98
- Terazono, H., Mutoh, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Akiyama, M., Udo, M., Ohdo, S., Okamura, H., and Shibata, S. (2003). Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:6795–6800. 78
- 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.*, 133:659–669. 38
- Terman, M. and Terman, J. S. (2005). Light therapy for seasonal and nonseasonal depression: Efficacy, protocol, safety, and side effects. *CNS Spectr*, 10:647–63. 114
- Thanbichler, M., Viollier, P. H., and Shapiro, L. (2005). The structure and function of the bacterial chromosome. *Curr Opin Genet Dev*, 15:153–162. 14
- Theodosios, D., Poulain, D., and Olier, S. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological Reviews*, 88:983. 82
- Thorey, I., Rode, I., Harnau, G., and Harde-land, R. (1987). Conditionality of phase resetting by inhibitors of 80S translation in *Gonyaulax polyedra*. *JCP*, 157B:85–89. 26
- Tosini, G., Davidson, A., Fukuhara, C., Kasamatsu, M., and Castanon-Cervantes, O. (2007). Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *The FASEB Journal*, 21:3866. 84
- Tosini, G. and Fukuhara, C. (2003). Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J Neuroendocrinol*, 15:364–369. 84
- Tosini, G., Pozdeyev, X., Sakamoto, K., and Iuvone, P. M. (2008). The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays*, 30:624–633. 84
- Tousson, E. and Meissl, H. (2004). Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*, 24:2983–2988. 74
- 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. 16
- Tsuno, N., Besset, A., and Ritchie, K. (2005). Sleep and depression. *J Clin Psychiatry*, 66:1254–69. 114
- Turek, F. W. and Allada, R. (2002). Liver has rhythm. *Hepatology*, 35:743–745. 100
- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., and Bass, J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science*, 308:1043–1045. 105, 109
- Tyson, J. J. (1987). Size control of cell division. *Journal of theoretical biology*, 126:381–391. 33

- van Houwelingen, C. A. and Beersma, D. G. (2001). Seasonal changes in 24-h patterns of suicide rates: A study on train suicides in The Netherlands. *J Affect Disord*, 66:215–223. 113
- van Reeth, O., Olivares, E., Zhang, Y., Zee, P. C., Mocaer, E., Defrance, R., and Turek, F. W. (1997). Comparative effects of a melatonin agonist on the circadian system in mice and syrian hamsters. *Brain Research*, 762(1-2):185–194. 84, 89
- vanden Driessche, T. (1966). Circadian rhythms in *Acetabularia*: Photosynthetic capacity and chloroplast shape. *Exp. Cell Research*, 42:18–30. 38
- vanden Driessche, T. (1967). The nuclear control of the chloroplasts' circadian rhythms. *Sci. Progr., Oxford*, 55:293–303. 38
- vanden Driessche, T. (1970). Inability of rifampicin to inhibit circadian rhythmicity in *Acetabularia* in spite of RNA synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 224:631–634. 40, 42
- vanden Driessche, T. and Bonotto, S. (1969). The circadian rhythm in RNA synthesis in *Acetabularia mediterranea*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 179:58–66. 38
- 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. 38
- 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. 32
- Vollrath, L. (2002). Chronoendocrinology—quo vadis? *Ann Anat*, 184:583–593. 70
- Wagner, V., Gessner, G., Heiland, I., Kaminski, M., Hawat, S., Scheffler, K., and Mittag, M. (2006). Analysis of the phosphoproteome of *Chlamydomonas reinhardtii* provides new insights into various cellular pathways. *Eukaryot Cell*, 5:457–468. 44
- Wagner, V., Gessner, G., and Mittag, M. (2005). Functional proteomics: A promising approach to find novel components of the circadian system. *Chronobiol Int*, 22:403–415. 44
- Wainright, P., Hinkle, G., Sogin, M., and Stickel, S. (1993). Monophyletic origins of the metazoa: An evolutionary link with fungi. *Science*, 260:340–342. 53
- Warren, W. S. and Cassone, V. M. (1995). The pineal gland: Photoreception and coupling of behavioral, metabolic, and cardiovascular circadian outputs. *J Biol Rhythms*, 10:64–79. 89
- Wehr, T. and Goodwin, F. K. (1975). Bi rhythms and manic-depressive illness. In *128th annual meeting of the American Psychiatric Association, Anaheim, May*. 114
- 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. 72

- Welsh, D. K., Yoo, S. H., Liu, A. C., Takahashi, J. S., and Kay, S. A. (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Current Biology*, 14:2289–2295. 79, 91
- White, W. B. (2007). Importance of blood pressure control over a 24-hour period. *J Manag Care Pharm*, 13(8 Suppl B):34–39. 105
- Wijnen, H. and Young, M. (2006). Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annual Review of Genetics*, 40:409. 114
- Winokur, A., Gary, K., Rodner, S., Rae-Red, C., Fernando, A., and Szuba, M. (2001). Depression, sleep physiology, and antidepressant drugs. *Depression and Anxiety*, 14:19–28. 114
- Wirz-Justice, A. and van den Hoofdakker, R. H. (1999). Sleep deprivation in depression: What do we know, where do we go? *Biol Psychiatry*, 46:445–453. 114
- Wolk, R., Gami, A. S., Garcia-Touchard, A., and Somers, V. K. (2005). Sleep and cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol*, 30:625–662. 114
- Wollnik, F. (1995). Die innere Uhr der Säugetiere. *Biologie in unserer Zeit*, 25:37–43. 70, 88
- 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. 40
- Xu, Y., Mori, T., and Johnson, C. H. (2003). Cyanobacterial circadian clockwork: Roles of KaiA, KaiB and the kaiBC promoter in regulating KaiC. *EMBO J*, 22:2117–2126. 11
- Yagita, K. (2004). Signal transduction pathways resetting the mammalian circadian clock in cultured fibroblast cell lines (entrainment of biological clocks, Symposium, Proceeding of the annual Meeting of the Zoological Society of Japan). *Zoological science*, 21:1235–1236. 92
- Yagita, K., Tamanini, F., van der Horst, G., and Okamura, H. (2001). Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, 292:278–281. 92
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., and Okamura, H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, 302:1408–1412. 73
- Yamanaka, I., Koinuma, S., Shigeyoshi, Y., Uchiyama, Y., and Yagita, K. (2007). Presence of robust circadian clock oscillation under constitutive over-expression of *mcry1* in rat-1 fibroblasts. *FEBS Letters*, 581:4098–4102. 71
- Yamazaki, S., Kerbeshian, M. C., Hocker, C. G., Block, G. D., and Menaker, M. (1998). Rhythmic properties of the hamster suprachiasmatic nucleus in vivo. *J Neurosci*, 18:10709–10723. 74, 91
- Yang, Y. H., Cheng, P., Zhi, G., and Liu, Y. (2001). Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY. *J. Biol. Chemistry*, 276:41064–41072. 60
- Yildiz, B. O., Suchard, M. A., Wong, M.-L., McCann, S. M., and Licinio, J. (2004). Alterations in the dynamics of circulating

- ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:10434–10439. 108, 109
- Yoshikawa, T. and Oishi, T. (1998). Extraretinal photoreception and circadian systems in nonmammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 119:65–72. 90
- Young, M. E. (2006). The circadian clock within the heart: potential influence on myocardial gene expression, metabolism, and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290:H1–16. 92
- Zghoul, T., Abarca, C., Sanchis-Segura, C., Albrecht, U., Schumann, G., and Spanagel, R. (2007). Ethanol self-administration and reinstatement of ethanol-seeking behavior in Per1(Brdm1) mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 190:13–19. 112
- Zhu, Y., Brown, H. N., Zhang, Y., Stevens, R. G., and Zheng, T. (2005). Period3 structural variation: a circadian biomarker associated with breast cancer in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14:268–270. 106
- Ziegler, O., Quilliot, D., and Guerci, B. (2000). Physiopathology of obesity. Dietary factors, and regulation of the energy balance. *Ann Endocrinol (Paris)*, 61 Suppl 6:12–23. 111