

Zum Einfluß der Zeitgeberstärke auf die Phasenlage der synchronisierten circadianen Periodik

KLAUS HOFFMANN

Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Seewiesen und Erling-Andechs

Eingegangen am 11. Dezember 1968

On the Influence of Strength of Zeitgeber on Phase in Synchronized Circadian Periodicities

Summary. 1. The synchronizing effect of four sinusoidal temperature cycles of different amplitude on the circadian rhythm of locomotor activity in lizards (*Lacerta sicula*) was measured. The results were compared with the influence of forcing oscillations of different strength on single self-sustained oscillations in the technical sense.

2. The number of animals synchronized with the temperature cycle decreased with decreasing amplitude of this cycle (Table 2). Especially those animals were not entrained, in temperature cycles with smaller amplitude, whose free running period deviated strongest from that of the zeitgeber (Fig. 4). This behaviour corresponds closely to that of self-sustained oscillations which can be entrained by forcing oscillations within limited ranges of entrainment only, the width of which depends on the strength of the external excitation.

3. The phase angle difference between circadian periodicity and temperature cycle depended on a) the free-running frequency of the circadian oscillation, and b) the amplitude of the synchronizing temperature cycle (Fig. 5). This behaviour coincides with that of technical coupled oscillators (in this case with unipolar coupling), in which phase angle difference depends upon a) the difference of natural frequencies, b) the strength of coupling.

4. The time necessary to synchronize the circadian rhythm after an inversion of the temperature oscillation increased with decreasing amplitude of the latter (Fig. 6). This corresponds to the dependence of transient time on strength of excitation in technical oscillations.

5. The direction of phase shift of the circadian oscillation after inversion of the zeitgeber cycle depended on the free running period of the circadian rhythm (Fig. 7).

6. Phase angle difference before and after a phase jump of the zeitgeber oscillation showed greater differences in temperature cycles with small amplitude (Fig. 8). These findings indicate that phase control is less rigid with weak zeitgebers.

7. The results demonstrate that the circadian oscillation can normally be described as a single self-sustained oscillation (though a number of other findings has shown that it probably consists of a multitude of oscillators). Models based on such an assumption are therefore adequate to describe the gross behaviour of the circadian oscillation. It is stressed that the features of the circadian periodicity shown here (point 2 to 4) are valid for all single self-sustained oscillations under the influence of a forcing oscillation, regardless of their special mechanism of excitation. The findings can therefore not be considered as supporting a particular single oscillator model.

Zusammenfassung. 1. Der synchronisierende Einfluß von vier sinusförmigen Temperaturcyclen verschiedener Amplitude auf die circadiane Periodik der Laufaktivität von Eidechsen wurde untersucht. Die Befunde werden mit dem Einfluß von Erregerschwingungen verschiedener Stärke auf einfache technische selbsterregte Schwingungen verglichen.

2. Die Zahl der synchronisierten Tiere nahm mit abnehmender Amplitude des synchronisierenden Temperaturcyclus ab. Bei kleiner Zeitgeberamplitude waren vor allem solche Tiere nicht mehr synchronisiert, deren Spontanfrequenz stärker von der Frequenz des Zeitgebercyclus abwich. Dies entspricht dem Verhalten selbsterregter Schwingungen, die von Erregerschwingungen nur in begrenzten Mitnahmebereichen synchronisiert werden können; die Mitnahmebereiche sind um so breiter, je stärker die Erregung ist.

3. Die Phasenwinkeldifferenz zwischen circadianer Periodik und Temperaturcyclus zeigte eine deutliche Abhängigkeit von a) der Spontanfrequenz der circadianen Periodik, b) von der Amplitude des Temperaturcyclus. Dies entspricht dem Verhalten von gekoppelten Schwingungen (hier mit unipolarer Koppelung), bei denen die Phasenwinkeldifferenz von a) der Differenz der Eigenfrequenzen der beiden Schwingungen und b) von der Stärke der Koppelung abhängt.

4. Die für die Resynchronisation der circadianen Periodik nach Phasensprung des Zeitgebers benötigte Zeit nahm mit abnehmender Amplitude des synchronisierenden Temperaturcyclus deutlich zu. Dies entspricht bei technischen Schwingungen der Abhängigkeit der Dauer der Einschwingvorgänge von der Stärke der Erregung.

5. Die Richtung der Phasenverschiebung der biologischen Schwingung nach Inversion der Zeitgeberschwingung hing von der Spontanfrequenz der circadianen Periodik ab.

6. Die Phasenwinkeldifferenz vor und nach einem Phasensprung des Zeitgebers zeigte bei Temperaturcyclen mit kleiner Amplitude größere Unterschiede. Dieser Befund wird als Hinweis gedeutet, daß bei schwächerem Zeitgeber die Phasenkontrolle weniger rigid ist.

7. Diese Befunde stimmen mit der Annahme überein, daß die circadiane Periodik sich im allgemeinen als einfache selbsterregte Schwingung betrachten läßt (obwohl eine Reihe von anderen Befunden darauf hinweist, daß sie aus einer Mehrzahl von Oscillatoren zusammengesetzt ist). Modelle dieser Art sind demnach zur Beschreibung der circadianen Periodik geeignet. Es wird betont, daß die hier unter Punkt 2—4 für die circadiane Periodik nachgewiesenen Eigenschaften für alle selbsterregten Schwinger mit einem Freiheitsgrad unabhängig vom Anfachungsmechanismus gelten. Sie können daher nicht als Stütze spezifischerer Modelle betrachtet werden.

Einleitung

Die Tagesperiodik biologischer Funktionen beruht in vielen Fällen auf einer endogenen circadianen Periodik, die von Zeitgebern (ASCHOFF, 1954) mit der Erdumdrehung synchronisiert wird. Für diese circadiane Periodik sind Modelle entwickelt worden, die von der Annahme ausgehen, daß sie als selbsterregte Schwingung im technischen oder mathematischen Sinne angesehen werden kann und sich somit den für diese gültigen Gesetzmäßigkeiten fügt (vgl. PITTENDRIGH und BRUCE, 1957; PITTENDRIGH, 1960; WEVER, 1962, 1964, 1965; ASCHOFF, 1964a).

Eine selbsterregte Schwingung kann von einer Erregerschwingung nur in begrenzten Frequenzbereichen mitgenommen werden. Die Größe

der „Mitnahmebereiche“ hängt dabei von der Stärke der Erregung ab (bei der circadianen Periodik entspräche dies der Zeitgeberstärke); ebenso ist die Dauer der Einschwingvorgänge nach Phasenverschiebung der Erregerschwingung abhängig von der Stärke der Erregung (KLOTTER, 1960; MAGNUS, 1961; WEVER, 1962, 1965, 1966). Darüber hinaus lassen sich auch für die Phasenbeziehungen zwischen synchronisierter Schwingung und Erregerschwingung allgemeine Aussagen machen. Sie hängen einmal ab von der Differenz der Eigenfrequenzen, zum anderen von der Stärke der Koppelung (WEVER, 1965). Danach ergeben sich für die durch Zeitgeber synchronisierte circadiane Periodik die folgenden Voraussagen: 1. Bei gleicher Zeitgeberstärke sollte die biologische Schwingung relativ zum Zeitgeber um so früher liegen, je höher ihre — in konstanten Bedingungen direkt meßbare — Eigenfrequenz ist. 2. Bei gleicher Eigenfrequenz der circadianen Periodik sollte der Betrag der Phasenwinkeldifferenz zwischen biologischer Periodik und Zeitgeberperiodik um so größer sein, je schwächer der Zeitgeber ist. Die Richtigkeit der ersten Voraussage ist für die circadiane Periodik von Finken (ASCHOFF und WEVER, 1962, 1966) und Eidechsen (HOFFMANN, 1963) nachgewiesen. Ein eindeutiger Nachweis für die Richtigkeit der zweiten Voraussage fehlt. Auch über die Abhängigkeit der Größe des Mitnahmebereiches von der Zeitgeberstärke fehlen quantitative Angaben. Eine quantitative Untersuchung der Dauer der Resynchronisationszeit nach Phasensprung des Zeitgebers in Abhängigkeit von der Zeitgeberstärke steht ebenfalls noch aus.

Es erschien daher sinnvoll, Ergebnisse, die aus Versuchen mit anderer Fragestellung (HOFFMANN, 1968a) vorlagen, für einen Vergleich des Verhaltens der circadianen Periodik mit dem technischer Schwingungen heranzuziehen. Hierbei wurden Untersuchungen mit Temperaturcyclen verschiedener Amplitude betrachtet.

Material und Methodik

Als Versuchstiere dienten Männchen der Ruineidechse (*Lacerta sicula* RAFINESQUE), deren lokomotorische Aktivität, für jedes Tier getrennt, über längere Zeit registriert wurde. Die Tiere wurden vom Tierhandel bezogen. Die Versuchskäfige entsprachen den früher verwendeten (s. HOFFMANN, 1960), die Bewegungen der Käfige wurden durch Photozellen erfaßt und mit Zeitmarkenschreibern registriert (vgl. Abb. 1—3). Während der Versuche befanden sich die Eidechsen in Dauerlicht konstanter Intensität, die Temperatur wurde entweder konstant gehalten oder änderte sich in einem ungefähr sinusförmigen Cyclus. Es wurden vier verschiedene Temperaturcyclen verwendet.

Die Licht- und Temperaturbedingungen sowie sonstige Einzelheiten für die Versuche mit einer Schwingungsbreite des Temperaturcyclus von 7,2° C sind in HOFFMANN (1963) angegeben. Die Periode des Temperaturcyclus betrug in diesem Falle 24 Std. — Bei den Versuchen mit Temperaturcyclen von 3,6, 1,6 und 0,9° C Schwingungsbreite standen jeweils 8 Käfige in einem Raum. Die Tiere waren in den Käfigen optisch voneinander isoliert. Sie wurden von oben durch Leuchtstoff-

röhren beleuchtet, die über ein Klein-Thyralux-Gerät in einem bestimmten Bereich auf beliebige Intensität einreguliert werden konnten. Um cyclische Intensitätsänderungen durch die Spannungsschwankungen des Ortsnetzes auszuschließen, wurden sie über einen Spannungsstabilisator betrieben (Einzelheiten s. WEVER, 1967). Unter den Röhren war eine Kunststoffolie angebracht, die das Licht streute. Die zu den Leuchtstoffröhren gehörenden Vorschaltgeräte (Vorheiztransformatoren und Drosseln) waren außerhalb des Raumes montiert, um zusätzliche Strahlungsquellen zu vermeiden. Die Beleuchtungsstärke in den Registrierkäfigen variierte von Käfig zu Käfig zwischen 22 und 41 Lux, blieb aber im Einzelkäfig während des ganzen Versuches konstant. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Klimagerätes durch einen auf Cyclen verschiedener Länge einstellbaren Programmregler gesteuert. Die Periodenlänge betrug immer 23,95 Std. Die Temperaturänderungen erfaßten den ganzen Raum und waren für alle Tiere gleich (Thermographen-Beispiele s. HOFFMANN, 1968a). Die relative Luftfeuchte war auf $50 \pm 3\%$ einreguliert, innerhalb dieser Schwankungsbreite folgte sie insbesondere beim Cyclus von $18,5-22,1^\circ\text{C}$ dem Temperaturcyclus. Tabelle I gibt den gesamten Versuchsverlauf wieder. Die Versuchsdauer war nicht für alle Eidechsen gleich, da kranke Tiere oder solche mit geringer Aktivität durch andere ersetzt wurden.

Tabelle I. *Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Versuche (30. 11. 66 bis 30. 11. 67)*

| Datum | Temperaturbedingungen | Phasensprung des Temperatureyclus | |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|
| | | am | Betrag |
| 30. 11. bis 21. 12. | konstant 21°C | | |
| 21. 12. bis 6. 2. | Cyclus $18,5-22,1^\circ\text{C}$ | 9. 1. | 12 Std (Inversion) |
| 6. 2. bis 24. 2. | konstant $20,4^\circ\text{C}$ | | |
| 24. 2. bis 27. 4. | Cyclus $19,4-21^\circ\text{C}$ | 20. 3 | 12 Std (Inversion) |
| 27. 4. bis 24. 5. | konstant $19,3^\circ\text{C}$ | | |
| 24. 5. bis 27. 10. | Cyclus $18,8-19,7^\circ\text{C}$ | 26. 6. 8. 8. 13. 9. | 12 Std (Inversion) 9 Std (verspätet) 9 Std (verfrüht) |
| 27. 10. bis 30. 11. | konstant 19°C | | |

Zur Auswertung wurden die Aktogramme von 5 Personen¹ beurteilt und bei konstanter Temperatur die Periodenlänge bzw. in den Fällen voller Synchronisation mit dem Temperatureyclus die Phasenlage relativ zum Zeitgebercyclus bestimmt. Die Beurteiler bestimmten außerdem die Zahl der Perioden, nach der bei einem Phasensprung des Zeitgebers die biologische Periodik wieder voll mit dem Temperatureyclus synchronisiert war. Den in dieser Arbeit verwendeten Daten liegen jeweils die Mittelwerte der 5 Bestimmungen zugrunde. Insgesamt wurden 49 Versuche mit 29 Tieren verwertet.

Ergebnisse

Sowohl in konstanter Temperatur als auch während der Temperaturcyclen war eine klare Periodik der Aktivität fast immer zu erkennen (vgl.

1. Ich danke Fräulein Dr. U. v. ST. PAUL und den Herren Prof. J. ASCHOFF, Dr. E. GWINNER, Dr. H. POHL und Dr. R. WEVER für ihre bereitwillige Hilfe beim Auswerten.

Abb. 1—3). Das Aktivitätsmuster war monophasisch und entsprach dem in anderen Versuchen mit niedriger Temperatur und geringer Beleuchtungsstärke bei Eidechsen beobachteten Typ (vgl. HOFFMANN, 1960). Maskierende Wirkungen (ASCHOFF, 1960, 1963) durch die Zeitgebercyclen wurden in keinem Falle beobachtet.

Einen Überblick über die synchronisierende Wirkung der Temperaturcyclen gibt Tabelle 2. Man erkennt, daß mit abnehmender Amplitude des

Tabelle 2. Übersicht über das Ergebnis aller Versuche. Der Einfluß des Temperaturcyclus auf die circadiane Schwingung wurde als eindeutig bezeichnet, wenn alle 5 Beurteiler übereinstimmten. Bei den Fällen, in denen die Synchronisation als wahrscheinlich angegeben ist, ließ sich wegen der Streuung der biologischen Daten nicht einwandfrei entscheiden, ob volle Synchronisation oder nur starke relative Koordination vorlag. Der Übergang zwischen diesen beiden Formen möglicher Zeitgebereinflüsse ist fließend [vgl. HOFFMANN (1968 b)]

| Schwingungsbreite des Temperaturcyclus | 7,2° C | 3,6° C | 1,6° C | 0,9° C |
|--|---------|--------|--------|---------|
| Zahl der Versuche (Tiere) | 18 (13) | 8 (8) | 8 (8) | 15 (15) |
| Davon: | | | | |
| eindeutig voll synchronisiert | 17 (12) | 6 | 6 | 5 |
| wahrscheinlich voll synchronisiert | — | 1 | 1 | 5 |
| eindeutig teilweise Mitnahme (relative Koordination oder zeitweiliges „Hängenbleiben“) | — | 1 | 1 | 1 |
| wahrscheinlich teilweise Mitnahme | 1 | — | — | 1 |
| kein Einfluß des Temperaturcyclus erkennbar | — | — | — | 3 |

Temperaturcyclus die Zahl der eindeutig voll synchronisierten Tiere abnimmt. Bei einer Schwingungsbreite von 7,2° C waren die Eidechsen in fast allen Versuchen eindeutig synchronisiert, bei 3,6 und 1,6° C Schwingungsbreite noch in 75% der Fälle, bei 0,9° C Schwingungsbreite nur noch in einem Drittel der Versuche. Immerhin ist es erstaunlich, daß selbst bei einer so geringen Amplitude der Temperaturcyclus die circadiane Periodik noch in einer großen Anzahl von Fällen zu beeinflussen vermochte. Ein Aktogrammbeispiel für eine Synchronisation durch den Temperaturcyclus mit der kleinsten Amplitude gibt Abb. 1. In einer Reihe von Fällen trat „relative Koordination“ (v. HOLST, 1939) auf, wie sie für das Verhalten einer selbsterregten Schwingung eben außerhalb des Mitnahmebereiches charakteristisch ist (WEVER, 1962). Ein Aktogrammbeispiel gibt Abb. 2. Schließlich kam es auch vor, daß die circadiane Periodik vom Zeitgeber zwar für kurze Zeit voll synchronisiert wurde, dann aber wieder freilief (zeitweiliges „Hängenbleiben“). Ein Beispiel gibt Abb. 3.

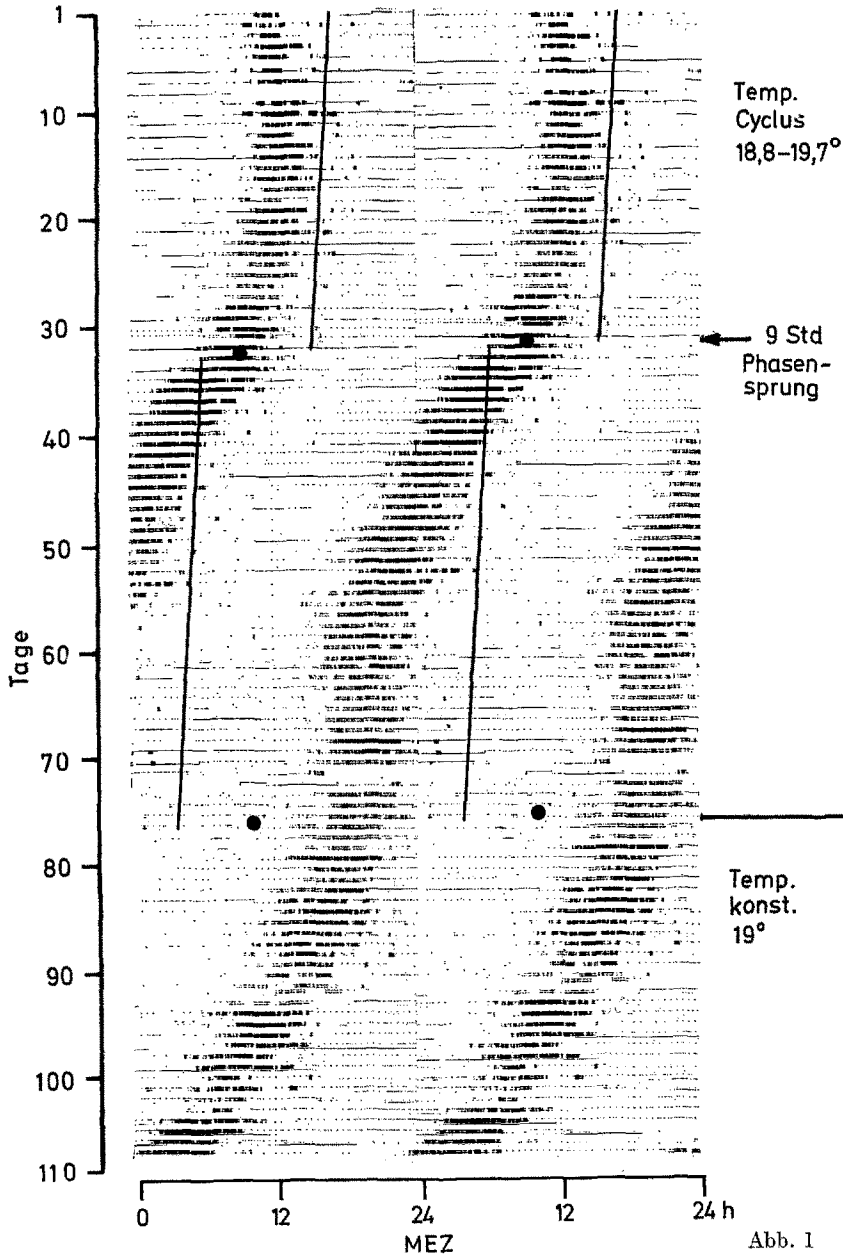


Abb. 1. Lokomotorische Aktivität einer Eidechse in einem Temperaturcyclus von $0,9^{\circ}\text{C}$ Schwingungsbreite und in konstanter Temperatur. Die Aktivitätsperiodik wird durch den Cyclus der Außentemperatur synchronisiert, folgt zögernd einem Phasensprung des Temperaturcyclus von 9 Std und ist nach etwa 22 Tagen wieder synchronisiert. In konstanter Temperatur zeigt die circadiane Periodik ihre Eigen-

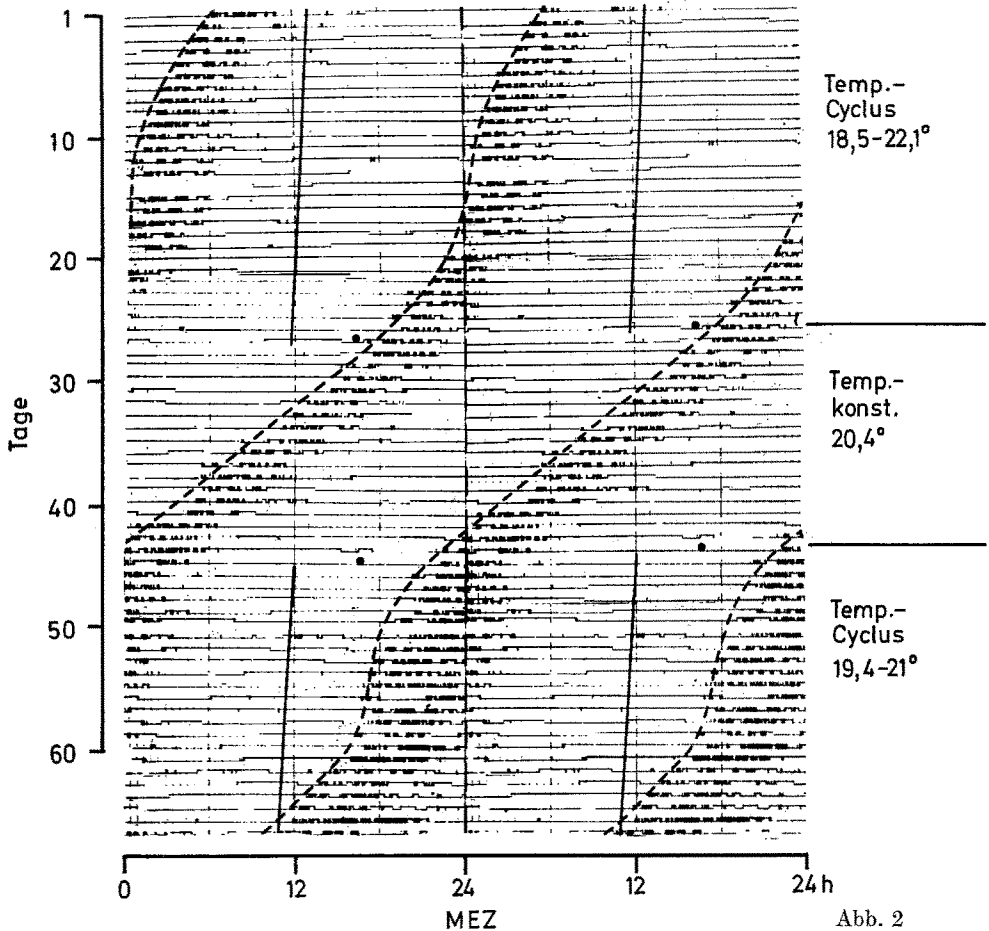


Abb. 2. Aktogrammbeispiel für relative Koordination. Lokomotorische Aktivität einer Eidechse in zwei verschiedenen Temperaturcyclen und in konstanter Temperatur. Die circadiane Periodik wird zwar durch die Temperaturcyclen in ihrer Frequenz beeinflusst, aber nicht voll synchronisiert. Man beachte, daß die Phase des „Fast-mitgenommen-werdens“ (Wendepunkt der durch die Aktivitätsanfänge gezogenen Linie) bei einer Schwingungsbreite des Temperaturcyclus von nur 1,6° C relativ zum Zeitgeber sehr viel weiter vorn liegt als bei einer Schwingungsbreite von 3,6° C. Die gestrichelte Linie entspricht ungefähr der Verbindungslinie durch die Aktivitätsanfänge. Sonstige Erklärungen s. Abb. 1. Aus HOFFMANN, 1968a

frequenz. Originalregistrierung mit Zeitmarkenschreiber; die Registrierstreifen von 108 Tagen sind untereinander geklebt. Zur besseren Übersicht ist die Registrierung rechts noch einmal wiederholt. Die ausgezogenen, nahezu vertikalen Linien verbinden die Zeiten des Temperaturmaximums, die schwarzen Punkte symbolisieren den Zeitpunkt des Phasensprunges des Temperaturcyclus bzw. des Überganges in konstante Temperatur

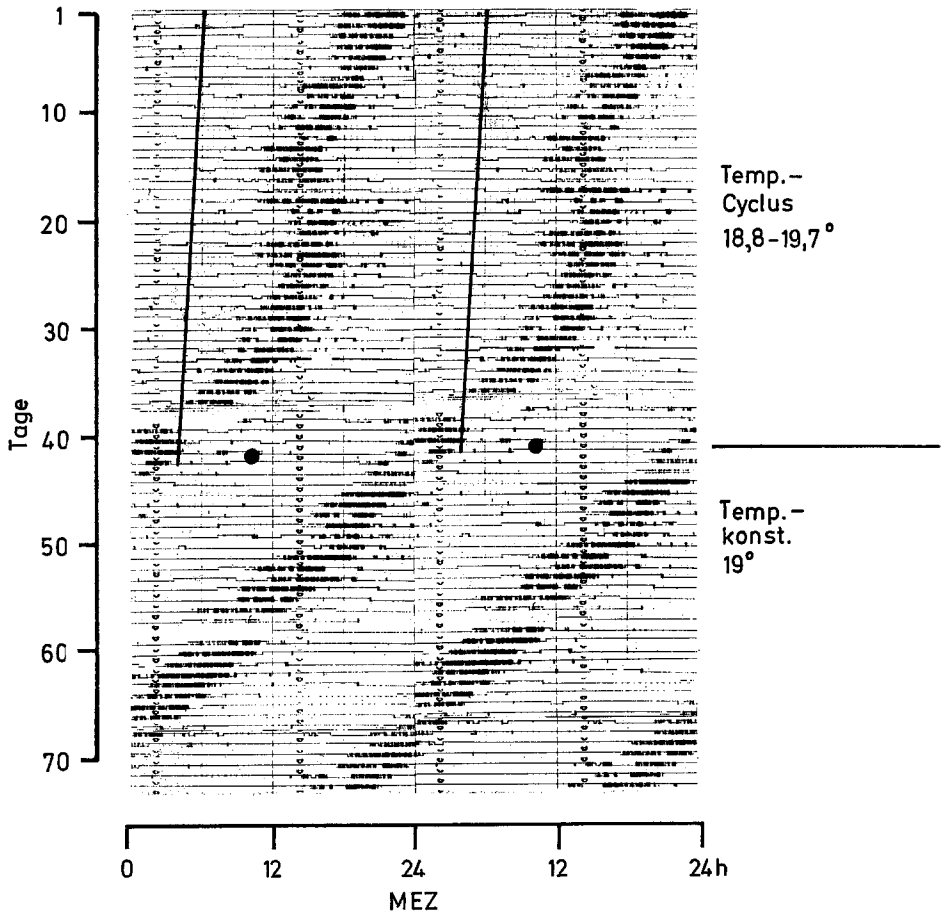


Abb. 3. Lokomotorische Aktivität einer Eidechse in einem Temperaturcyclus von $0,9^{\circ}\text{C}$ Schwingungsbreite und in konstanter Temperatur. Hier bleibt der Aktivitätscyclus kurzfristig im Temperaturcyclus „hängen“, ist aber nicht dauerhaft synchronisiert. Zeichenerklärung s. Abb. 1

In Abb. 4. wurde die Wirkung der Temperaturcyclen in Abhängigkeit von der Spontanperiode der biologischen Schwingung aufgetragen. Die Spontanperiode wurde in allen Fällen unmittelbar vor oder nach dem Versuch im Temperaturcyclus in konstanter Temperatur bestimmt². Lagen für beide Zeiten Werte vor, so wurde der Mittelwert verwendet. Die

2. Ein ins Gewicht fallender Einfluß der geringfügigen Unterschiede der Temperaturhöhe während der Zeiten konstanter Temperatur bzw. der mittleren Temperatur während der Temperaturcyclen auf die Spontanfrequenz ist nach früheren Untersuchungen (HOFFMANN, 1957) kaum zu erwarten.

Zahl der Versuche reicht zwar für eine quantitative Behandlung nicht aus, man erkennt aber, daß in den flacheren Temperaturecyclen die Tiere mit stark von der Zeitgeberperiode abweichenden Spontanperioden nicht mehr voll synchronisiert sind. Die Temperaturecyclen mit kleinerer Schwingungsbreite wirken als schwächere Zeitgeber, der Mitnahmebereich wird kleiner.

Eine auch quantitativ befriedigende Abhängigkeit sowohl von der Spontanfrequenz der biologischen Periodik als auch von der Zeitgeberstärke zeigte die Phasenlage der synchronisierten Aktivitätsperiodik der

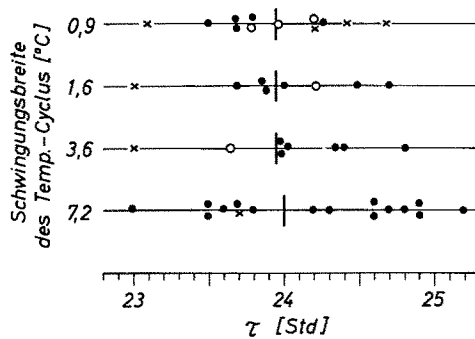


Abb. 4. Übersicht über die Wirkung der Temperaturecyclen auf die circadiane Periodik in Abhängigkeit von der Spontanperiode (τ). Bei den Temperaturecyclen mit 7,2° C und 0,9° C Schwingungsbreite sind weniger Werte angegeben als in Tabelle 2, da in einigen Fällen die Aufzeichnung in konstanter Temperatur zu kurz war, um die Periodenlänge bestimmen zu können. Zeichenerklärung: • deutlich voll synchronisiert, o wahrscheinlich voll synchronisiert, x deutlich nicht voll synchronisiert. Die senkrechten Linien bei $\tau = 23,95$ bzw. 24 Std markieren die Periodenlänge des einwirkenden Temperaturecyclus

Eidechsen. Als Bezugspunkte für die Phasenwinkel der Zeitgeberschwingung wurden die Maxima der Temperaturecyclen, für die Phasenwinkel der biologischen Schwingung die Mitten der Aktivitätszeiten herangezogen. Bei den hier vorliegenden monophasischen Aktivitätsmustern bot sich die Aktivitätszeit-Mitte als markantester Punkt an, zumal sie auch meist mit dem Aktivitätsmaximum zusammenfiel. Zudem wurde auch in anderen Untersuchungen die Mitte der Aktivitätszeit als repräsentative Phase verwandt (ASCHOFF u. WEVER, 1962 b; HOFFMANN, 1963; ASCHOFF, 1964 b, 1965). Bei Wahl anderer Phasenpunkte (Aktivitätsbeginn oder -ende) ergab sich in Untersuchungen an Eidechsen im Prinzip das gleiche Bild (s. HOFFMANN, 1963).

In Abb. 5 ist die Phasenwinkeldifferenz zwischen biologischer Schwingung und Zeitgeber, getrennt für die vier verschiedenen Zeitgeber-

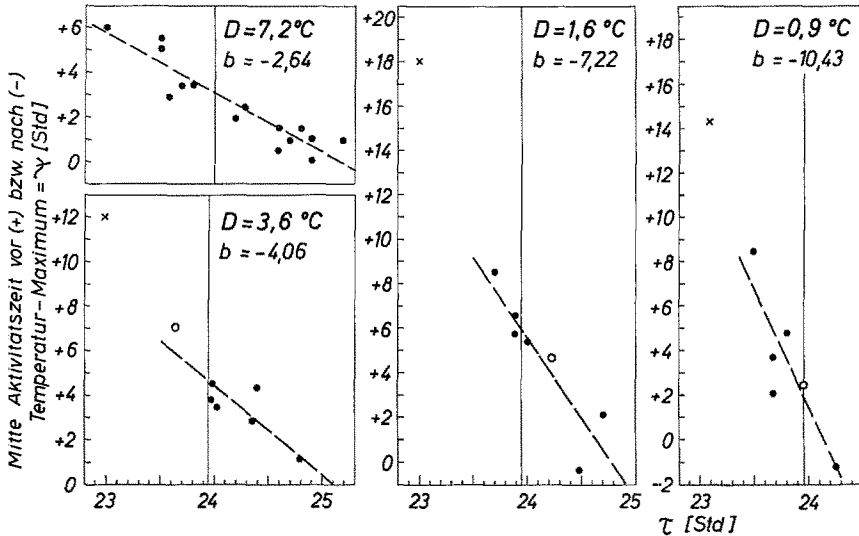


Abb. 5. Phasenwinkeldifferenzen zwischen Temperaturcyclus und biologischer Periodik in Abhängigkeit von der Spontanperiode der circadianen Periodik für vier Temperaturcyclen. Die berechneten Regressionsgeraden sind gestrichelt eingezeichnet ($b = b_{x,y}$). Man erkennt, daß sie mit abnehmender Amplitude des Temperaturcyclus steiler werden. Die — zur Berechnung der Regressionsgeraden nicht herangezogenen — Kreuze geben die Phasenlage des zeitweiligen Hängenbleibens bzw. die Stelle der Wendepunkte bei relativer Koordination wieder (vgl. Text und Abb. 2 u. 3). — Zeichenerklärung: ● Werte von Fällen mit eindeutig voller Synchronisation, ○ Werte von Fällen mit wahrscheinlich voller Synchronisation (vgl. Tabelle 2). Die vertikalen Linien markieren die Periodenlänge des Zeitgebers. — Statistik: Die Korrelationskoeffizienten sind signifikant und liegen zwischen $-0,855$ und $-0,962$. Die Differenzen zwischen den Regressionskoeffizienten bei $7,2^\circ\text{C}$ und $1,6^\circ\text{C}$ ($p < 0,005$) bzw. $0,9^\circ\text{C}$ Schwingungsbreite ($p < 0,0005$) und zwischen den Regressionskoeffizienten bei $3,6$ und $0,9^\circ\text{C}$ Schwingungsbreite ($p < 0,05$) sind signifikant. — Bei $7,2$ und $0,9^\circ\text{C}$ sind hier weniger Werte enthalten als in Tabelle 2, da in einigen Fällen die Aufzeichnung der Aktivität in konstanter Temperatur zur Bestimmung der Periodenlänge zu kurz war. Außerdem fehlen bei $0,9^\circ\text{C}$ Schwingungsbreite zwei der drei in Abb. 4 wiedergegebenen Werte von Fällen mit wahrscheinlich voller Synchronisation, da sich bei ihnen die Phasenlage nicht eindeutig bestimmen ließ.

amplituden, für alle Fälle von Synchronisation aufgetragen. Man erkennt einmal, daß bei gegebener Schwingungsbreite des synchronisierenden Temperaturcyclus die Mitte der Aktivitätszeit um so früher liegt, je kürzer die Spontanperiode der biologischen Schwingung ist. Das gilt nicht nur für die Fälle von voller Synchronisation, sondern auch bei zeitweisigem „Hängenbleiben“ am Zeitgeber und für die Wendepunkte bei relativer Koordination, wie die als Kreuze wiedergegebenen Werte zeigen (vgl. auch die Aktogrammbeispiele in Abb. 2 u. 3). Diese Befunde bestätigen

für die circadiane Periodik die Aussage der technischen Schwingungslehre, nach welcher bei Schwingungen, die von einer Erregerschwingung synchronisiert werden, die Phasenlage von der Differenz der Spontanperioden abhängt.

Betrachtet man die bei den verschiedenen Temperaturcyclen gefundenen Werte (s. Abb. 5), so ergeben sich deutliche Unterschiede. Je flacher der synchronisierende Temperaturcyclus, desto steiler ist die Regressionsgerade, die sich aus den Werten für die Phasenwinkeldifferenzen ergibt, desto mehr unterschieden sich dementsprechend die Phasenlagen bei gleicher Differenz der Spontanperiode. Bei stärkerem Zeitgeber dagegen umfassen die Werte für die Phasenwinkeldifferenzen einen kleineren Bereich. Die Abhängigkeit der Phasenlage von der Zeitgeberstärke gilt auch für die Phase stärkster relativer Mitnahme (Wendepunkt) bei relativer Koordination, wie Abb. 2 zeigt. Sie liegt im Temperaturcyclus von $3,6^{\circ}\text{C}$ Schwingungsbreite etwa 12 Std vor dem Temperaturmaximum: bei nur $1,6^{\circ}\text{C}$ Schwingungsbreite rückt sie weitere 6 Std nach vorn. Diese Befunde bestätigen für die circadiane Periodik das Gesetz der technischen Schwingungslehre, daß die Phasenlage der synchronisierten Schwingung von der Stärke der Erregung abhängt.

Die Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit der Zeitgeberperiode sollten bei den hier gewählten Bezugsphasen der Phasenwinkeldifferenz zwischen circadianer Periodik und Zeitgeber entsprechen, wenn beide die gleiche Frequenz haben. Da ungefähr sinusförmige Temperaturcyclen verwendet wurden, könnte man annehmen, daß sie bei allen Amplituden den gleichen Wert haben. Die Werte differieren jedoch bei den verschiedenen Zeitgebercyclen. Das könnte aber einmal daran liegen, daß insbesondere die flacheren Temperaturcyclen etwas von der idealen Sinusform abweichen (vgl. HOFFMANN, 1968 a, Abb. 1). Zum anderen sind die Regressionsgeraden bei den flachen Temperaturcyclen steiler, zufallsbedingte Abweichungen ihrer Lage fallen hier stärker ins Gewicht. Es erscheint daher zweifelhaft, daß diese Unterschiede real und relevant sind.

Eine eindeutige Abhängigkeit von der Zeitgeberstärke zeigten auch die Resynchronisationszeiten nach einer plötzlichen Phasenverschiebung des Zeitgebers. Die Resynchronisation wurde als abgeschlossen angesehen, wenn die Phasenwinkeldifferenz zwischen circadianer Periodik und Zeitgeber sich nicht mehr änderte (vgl. Abb. 1 und nächsten Absatz). In Abb. 6 ist die Dauer der Resynchronisation in Abhängigkeit von der Schwingungsbreite des synchronisierenden Temperaturcyclus für alle Fälle eindeutiger Synchronisation eingetragen. Man erkennt, daß die Resynchronisationsdauer mit abnehmender Zeitgeberstärke zunimmt; bei einem Temperaturcyclus von $0,9^{\circ}\text{C}$ Schwingungsbreite ist sie fast dreimal so lang wie bei $7,2^{\circ}\text{C}$ Schwingungsbreite, obwohl bei $0,9^{\circ}\text{C}$ der Phasensprung meist nur 9 Std betrug (vgl. Tabelle 1). Die Phasenverschiebung erfolgte teils durch Verkürzen der Perioden, teils durch Verlängern, ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen der Richtung der

Phasenverschiebung und der Resynchronisationszeit ließ sich nicht erkennen. Dagegen ergab sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Spontanfrequenz und der Richtung der Phasenverschiebung: Tiere mit kurzer Spontanperiode verkürzten während der Verschiebung die Periode, Tiere mit langer Spontanperiode verlängerten sie (Abb. 7). Das gilt nicht nur bei der in den meisten Fällen vorgenommenen Inversion der Zeitgeberschwingung (= Verschiebung um 12 Std); auch bei einem Phasen-

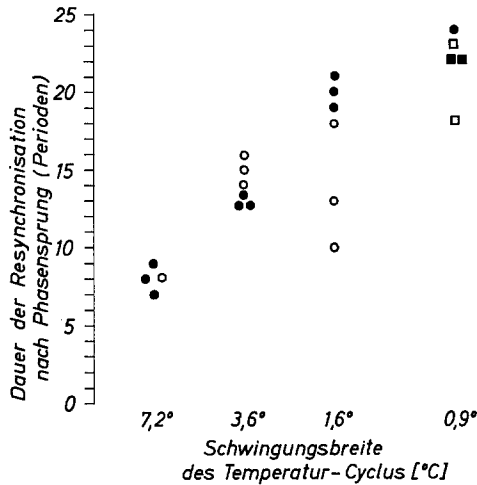


Abb. 6. Dauer der Resynchronisation der circadianen Periodik nach Phasensprung des Zeitgebers um 12 Std (Kreise) bzw. 9 Std (Quadrate) in Abhängigkeit von der Schwingungsbreite des synchronisierenden Temperaturcyclus. Die Phasenverschiebung der biologischen Periodik erfolgte durch Verkürzen (ausgefüllte Symbole) oder Verlängern (leere Symbole) der Perioden

sprung des Zeitgebers um 9 Std nach *vorn* erreichte ein Tier mit langer Spontanperiode die Resynchronisation durch Verlängern, es verschob seine Phase in diesem Fall um 15 Std nach hinten statt um 9 Std nach vorn.

Nach Phasensprung des Zeitgebers zeigte die Aktivitätsperiodik nicht immer die gleiche Phasenwinkeldifferenz zum Zeitgeber wie vor dem Phasensprung, obwohl volle Resynchronisation vorlag (vgl. Abb. 1). Die Phasenverschiebung der biologischen Schwingung entsprach somit nicht in allen Fällen der des Zeitgebers. So könnte z. B. einer der stark abweichenden Werte in Abb. 6 bei 1,6° C Schwingungsbreite des Temperaturcyclus durch eine solche Änderung der Phasenwinkeldifferenz nach Inversion des Zeitgebers zu erklären sein. Die Gesamtverschiebung der circadianen Schwingung betrug hier nicht 12, sondern 9 Std. Es war aber keineswegs immer so, daß durch die Änderung der Phasenwinkeldifferenz

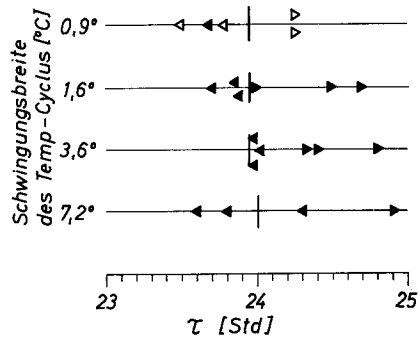


Abb. 7. Richtung der Phasenverschiebung der biologischen Periodik nach Phasensprung des Zeitgebers in Abhängigkeit von der Spontanperiode der biologischen Schwingung. — Zeichenerklärung: ◀ Phasenverschiebung durch Verkürzen, ▶ Phasenverschiebung durch Verlängern der Perioden. Der Phasensprung des Temperaturcyclus betrug 12 (ausgefüllte Symbole) bzw. 9 Std (leere Symbole). Die vertikalen Linien markieren die Periodenlänge der synchronisierenden Zeitgeberzyklen. — Beim Phasensprung um 9 Std wurde die Zeitgeberschwingung in drei Fällen nach vorn und nur in einem Fall (einer der beiden Werte bei $\tau = 24,25$ Std) nach hinten verschoben

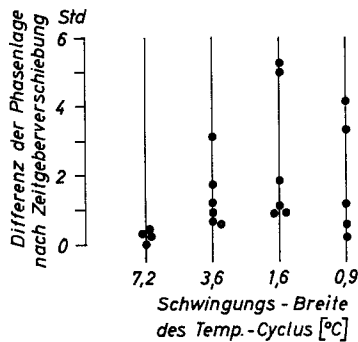


Abb. 8. Unterschied der Phasenwinkeldifferenz zwischen circadianer Periodik und Zeitgeberschwingung vor und nach Phasensprung des Zeitgebers in Abhängigkeit von der Schwingungsbreite des synchronisierenden Temperaturcyclus (vgl. Text)

nach Verschiebung des Zeitgebers die Phasenverschiebung der biologischen Schwingung geringer war als die des Zeitgebers: in 11 von 20 Fällen war sie sogar größer. Auch die Differenzen zeigten eine Abhängigkeit von der Zeitgeberstärke (s. Abb. 8): In Temperaturcyclen mit großer Schwingungsbreite kamen weniger große Abweichungen vor als bei kleiner Amplitude des Temperaturcyclus. Die Abweichungen könnten zum Teil auf Änderungen der Spontanperiode während des Phasensprungs des Zeitgebers beruhen, die sich besonders bei schwachem Zeitgeber stark auf die Phasenlage der synchronisierten Schwingung auswirken müßten.

Änderungen der freilaufenden Periode treten bei Eidechsen in konstanten Bedingungen gelegentlich spontan auf (HOFFMANN, 1960). Auch in Abhängigkeit von einmaligen Ereignissen wurden Veränderungen der Spontanperiode nachgewiesen (LOHMANN, 1967). Änderungen der Spontanperiode können aber die Abweichungen in der Phasenlage der biologischen Periodik nach Phasensprung des Zeitgebers nur zum Teil erklären (vgl. HOFFMANN, 1968 b, Abb. 1). Ihr verstärktes Auftreten in den flacheren Temperaturecyclen spricht dafür, daß bei schwächerem Zeitgeber die Phasenkontrolle weniger rigid ist.

Besprechung

1. Die vorgelegten Befunde stützen in allen wesentlichen Punkten die Annahme, daß die circadiane Periodik sich als *einfache* selbsterregte Schwingung beschreiben läßt, zumindest im Falle der monophasischen Aktivitätsperiodik. Die Abhängigkeit der Phasenwinkeldifferenz zwischen synchronisierter circadianer Periodik und Zeitgeberschwingung, einmal von der Spontanfrequenz der biologischen Periodik, zum anderen von der Zeitgeberstärke, entsprechen dem von technischen Schwingungen bekannten Verhalten ebenso wie die Abhängigkeit der Dauer der Resynchronisationszeit nach Phasensprung des Zeitgebers von der Zeitgeberstärke. Auch die Existenz eines Mitnahmebereiches und die Abhängigkeit seiner Größe von der Stärke der Fremderregung, wie sie für selbsterregte Schwingungen charakteristisch sind, ist in den hier geschilderten Versuchen angedeutet, wenn auch die Ergebnisse für einen quantitativen Nachweis nicht ausreichen. Modelle auf der Grundlage technischer selbsterregter Schwingungen sind danach zur Beschreibung der circadianen Periodik geeignet.

Diese Befunde weisen erneut auf die Tatsache hin, daß die circadiane Periodik endogener Natur ist und nicht durch unbekannt periodische Außenfaktoren verursacht wird, wie es BROWN (1962, 1965) immer wieder behauptet (Diskussion s. ASCHOFF, 1963; PITTENDRIGH, 1967). Periodische Außenfaktoren vermögen die circadiane Periodik zu synchronisieren oder können relative Koordination verursachen, wie es auch in dieser Arbeit gezeigt wird; sie sind aber nicht die Ursache der Periodik.

Mit der hier beschriebenen Abhängigkeit der Phasenlage der synchronisierten circadianen Periodik von ihrer Spontanfrequenz sind erneut Beweise dafür erbracht worden, daß eine Aussage über die Spontanfrequenz der biologischen Schwingung auch im synchronisierten Zustand möglich ist (vgl. ASCHOFF, 1964 a, 1965; ASCHOFF u. WEVER, 1962 a, 1966; HOFFMANN, 1963), allerdings nur unter der Voraussetzung, daß die Zeitgeberstärke bekannt ist oder bei den verglichenen Werten als gleich angenommen werden kann. Umgekehrt erlaubt die Abhängigkeit der

Phasenlage von der Zeitgeberstärke bei bekannter Spontanperiode Rückschlüsse auf die Zeitgeberstärke; es könnten somit auch verschiedene Zeitgebermodalitäten auf ihre Stärke untersucht und verglichen werden.

Nach Inversion des Zeitgebers ergab sich in den hier vorgelegten Untersuchungen eine eindeutige Abhängigkeit der Resynchronisationszeit von der Zeitgeberstärke (s. Abb. 6). Dabei hing es einzig von der Spontanfrequenz ab, ob die Resynchronisation durch Verkürzen oder Verlängern der Periode erfolgte (Abb. 7). Eine gesetzmäßige Abhängigkeit der Resynchronisationsgeschwindigkeit von der Richtung der Phasenverschiebung war nicht zu erkennen (vgl. Abb. 6). ASCHOFF u. WEVER (1963) haben an Vögeln ähnliche Versuche mit Licht-Dunkel-Cyclen durchgeführt. Sie fanden nach Inversion des Zeitgebers in allen Fällen eine Verschiebung durch Verlängern der Periode. Zu im wesentlichen ähnlichen Resultaten kommt WEVER (1966) aufgrund von Berechnungen mit einem von ihm für die circadiane Periodik entwickelten Modell. Die hier vorgelegten Befunde sprechen dafür, daß ein solches Verhalten zumindest nicht auf die Wirkung von anderen Zeitgebern verallgemeinert werden kann. Bei den Eidechsen in Temperaturcyclen war eher eine Tendenz festzustellen, nach Inversion des Zeitgebers die Periode zu verkürzen (s. Abb. 7). Das einheitliche Verhalten der Vögel nach Inversion des Zeitgebers könnte z. T. auch durch Maskierungseffekte durch den rechteckförmigen Licht-Dunkel-Cyclus vorgetäuscht sein, die bei den hier benützten sinusförmigen Temperaturcyclen nicht auftraten.

2. Es muß betont werden, daß die hier für die circadiane Periodik nachgewiesenen Eigenschaften für alle selbsterregten Schwinger mit einem Freiheitsgrad gelten (KLOTTER, pers. Mitt.; WEVER, pers. Mitt.). Sie können daher nicht als spezifische Stütze eines bestimmten Ein-Oscillator-Modells angesehen werden. Die Aussage, daß sich die circadiane Periodik wie ein einfacher selbsterregter Schwinger verhält, ist trotzdem nicht trivial. Eine Reihe von Beobachtungen hat gezeigt, daß verschiedene Funktionen auch im gleichen Organismus zur gleichen Zeit unter experimentellen Bedingungen unterschiedliche Frequenzen ihrer circadianen Periodik zeigen können (LOBBAN, 1960; ASCHOFF et al., 1967). Auch bei derselben Funktion, vor allem bei der lokomotorischen Aktivität, sind in konstanten Außenbedingungen gelegentlich Anteile mit — wenigstens zeitweilig — verschiedener Frequenz der circadianen Periodik beobachtet worden (MENAHER, 1959; PITTEDRIGH, 1960, 1961, 1967; SWADE u. PITTEDRIGH, 1967; HOFFMANN, 1969). Solche Befunde haben zusammen mit theoretischen Überlegungen zu der Folgerung geführt, daß der circadianen Periodik eines Tieres nicht *ein* Oscillator, sondern eine ganze Population von Oscillatoren zugrunde liegt (PITTEDRIGH, 1960, 1961, 1967; ASCHOFF, 1963). Diese Oscillatoren sind normalerweise gekoppelt und synchronisieren sich gegenseitig. Sie erscheinen dann unter dem Bilde

eines Oscillators und lassen sich, wie u. a. die hier vorgelegten Befunde zeigen, als eine selbsterregte Schwingung mit einem Freiheitsgrad beschreiben.

Aus den vorstehenden Erwägungen erhellt, daß Modelle, die nur das Gesamtverhalten der circadianen Periodik beschreiben, zumindest nicht unmittelbar zu Rückschlüssen auf die Natur der zugrunde liegenden Oscillatoren berechtigen. Wie weit sich aus den bisherigen Befunden Aussagen über sie und ihre Koppelung machen lassen, müssen weitere schwingungstheoretische Erwägungen klären. Ein allerdings nicht sehr weit durchgeführter Ansatz in dieser Richtung ist das Multi-Oscillatormodell von WINFREE (1967), der als Grundlage der circadianen Periodik eine Population von schwachgekoppelten Kippschwingern annimmt, die sich nur wenig in ihrer Spontanfrequenz unterscheiden. Auch ENRIGHT (pers. Mitt.) hat, ausgehend von ähnlichen Annahmen, ein Multi-Oscillatormodell entwickelt. PITTENDRIGH u. BRUCE (1957) haben ursprünglich ein Zwei-Oscillatormodell vorgeschlagen.

3. Überraschend war, daß selbst eine sehr geringe Amplitude des Temperaturcyclus die circadiane Periodik in einer recht großen Zahl von Fällen noch zu synchronisieren oder zumindest zu beeinflussen vermochte (vgl. Tabelle 2). Dieser Befund weist erneut darauf hin, wie wichtig es ist, beim Messen der spontanen circadianen Periodik in konstanten Bedingungen bei Poikilothermen auf sehr genaue Kontrolle der Temperatur zu achten. Bei Homoiothermen ist die Temperatur als Zeitgeber weit weniger wirksam (HOFFMANN, 1968 b) und kann daher eher vernachlässigt werden. Biologisch scheint die hohe Wirksamkeit selbst flacher Cyclen der Außentemperatur auf die circadiane Periodik bei Eidechsen sinnvoll. Sie ermöglicht es den Tieren, in unterirdischen Schlupfwinkeln, in denen der normale Tagesgang der Außentemperatur stark abgeflacht ist, auch noch nach längerem Aufenthalt mit dem normalen Außencyclus synchronisiert zu bleiben. Die Wichtigkeit der Temperatur als Zeitgeber bei Eidechsen wird auch durch die Untersuchung von EVANS (1966) unterstrichen, der bei gleichzeitiger Applikation von Licht- und Temperaturcyclen mit etwas verschiedener Periodenlänge fand, daß die Aktivität von Eidechsen vorwiegend dem Temperaturcyclus folgte.

Literatur

- ASCHOFF, J.: Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* **41**, 49—56 (1954).
 — Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **25**, 11—28 (1960).
 — Diurnal rhythms. *Ann. Rev. Physiol.* **25**, 581—600 (1963).
 — Biologische Periodik als selbsterregte Schwingung. *Arb. Gem. Forsch. Nordrh.-Westf. H.* **138**, 51—79 (1964a).

- ASCHOFF, J.: Die Tagesperiodik licht- und dunkelaktiver Tiere. *Rev. suisse Zool.* **71**, 528—558 (1964b).
- The phase-angle difference in circadian periodicity. J. ASCHOFF (ed.), *Circadian clocks*. Amsterdam: North-Holland Publ. Comp. 1965.
- U. GERBECKE, and R. WEVER: Desynchronization of human circadian rhythms. *Jap. J. Physiol.* **17**, 450—457 (1967).
- , u. R. WEVER: Über Phasenbeziehungen zwischen biologischer Tagesperiodik und Zeitgeberperiodik. *Z. vergl. Physiol.* **46**, 115—128 (1962a).
- — Beginn und Ende der täglichen Aktivität freilebender Vögel. *J. Ornith.* **103**, 1—27 (1962b).
- — Resynchronisation der Tagesperiodik von Vögeln nach Phasensprung des Zeitgebers. *Z. vergl. Physiol.* **46**, 321—335 (1963).
- — Circadian period and phase-angle difference in chaffinches (*Fringilla coelebs* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 397—404 (1966).
- BROWN, F. A., JR.: Extrinsic rhythmicity: a reference frame for biological rhythms under so-called constant conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **98**, 775—787 (1962).
- A unified theory for biological rhythms: rhythmic duplicity and the genesis of "circa" periodisms. J. ASCHOFF (ed.), *Circadian clocks*. Amsterdam: North-Holland Publ. Comp. 1965.
- EVANS, K. J.: Responses of locomotor activity rhythms of lizards to simultaneous light and temperature cycles. *Comp. Biochem. Physiol.* **19**, 91—103 (1966).
- HOFFMANN, K.: Über den Einfluß der Temperatur auf die Tagesperiodik bei einem Poikilothermen. *Naturwissenschaften* **44**, 358 (1957).
- Versuche zur Analyse der Tagesperiodik. I. Der Einfluß der Lichtintensität. *Z. vergl. Physiol.* **43**, 544—566 (1960).
- Zur Beziehung zwischen Phasenlage und Spontanfrequenz bei der endogenen Tagesperiodik. *Z. Naturforsch.* **18b**, 154—157 (1963).
- Synchronisation der circadianen Aktivitätsperiodik von Eidechsen durch Temperaturecyclen verschiedener Amplitude. *Z. vergl. Physiol.* **58**, 225—228 (1968a).
- Temperaturecyclen als Zeitgeber der circadianen Periodik. *Verh. dtsh. zool. Ges. Innsbruck* **62** (1968b) (im Druck).
- Die Aktivitätsperiodik von Tupajas (*Tupaia glis*) in konstantem Licht verschiedener Intensität. (In Vorb.).
- HOLST, E. v.: Die relative Koordination als Phänomen und als Methode zentralnervöser Funktionsanalyse. *Ergebn. Physiol.* **42**, 228—306 (1939).
- KLOTTER, K.: General properties of oscillating systems. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **25**, 185—187 (1960).
- LOBBAN, M. C.: The entrainment of circadian rhythms in man. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **25**, 325—332 (1960).
- LOHMANN, M.: Phase-dependent changes of circadian frequency after light steps. *Nature (Lond.)* **213**, 196—197 (1967).
- MAGNUS, K.: Schwingungen. Stuttgart: B. G. Teubner 1961.
- MENAKER, M.: Endogenous rhythms of body temperature in hibernating bats. *Nature (Lond.)* **184**, 1251—1252 (1959).
- PITTENDRIGH, C. S.: Circadian rhythms and the circadian organization. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **25**, 159—184 (1960).
- On the temporal organization of living systems. *Harvey Lect.* **56**, 93—125 (1961).
- Circadian rhythms, space research and manned space flight. In: *Life sciences and space research*. Amsterdam: North-Holland Publ. Comp. 1967.
- , and V. G. BRUCE: An oscillator model for biological clocks. D. Rudnick (ed.), *Rhythmic and synthetic processes in growth*, p. 75—109. Princeton: Univ. Press 1957.

- SWADE, R. H., and C. S. PITTEDRIGH: Circadian locomotor rhythms of rodents in the arctic. *Amer. Natur.* **101**, 431—466 (1967).
- WEVER, R.: Zum Mechanismus der biologischen 24-Stunden-Periodik. *Kybernetik* **1**, 139—154 (1962).
- Ein mathematisches Modell für biologische Schwingungen. *Z. Tierpsychol.* **21**, 355—372 (1964).
- A mathematical model for circadian rhythms. J. ASCHOFF (ed.), *Circadian clocks*. Amsterdam: North-Holland Publ. Comp. 1965.
- The duration of re-entrainment of circadian rhythms after phase shifts of the Zeitgeber. *J. theor. Biol.* **13**, 187—201 (1966).
- Zum Einfluß der Dämmerung auf die circadiane Periodik. *Z. vergl. Physiol.* **55**, 255—277 (1967).
- WINFREE, A. T.: Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. *J. theor. Biol.* **16**, 15—42 (1967).

Dr. KLAUS HOFFMANN
Max-Planck-Institut für Verhaltens-
physiologie
8131 Erling-Andechs