

**Physiologische Aspekte  
der circadianen Rhythmik  
bei Kleinsäugetern**

Von dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Haiko Dernbach  
geboren am 8. Juni 1970, in München

2002

Referent: Prof. Dr. Stephan Steinlechner  
Koreferent: Prof. Dr. Hansjoachim Hackbarth  
Tag der Promotion: 24. Januar 2003

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Tiere</b>	<b>7</b>
2.1.1	Zwerghamster	8
2.1.2	Mäuse	8
<b>2.2</b>	<b>Haltungsbedingungen</b>	<b>9</b>
<b>2.3</b>	<b>Lichtbedingungen</b>	<b>9</b>
2.3.1	Verwendete Lichtbedingungen	10
2.3.2	Erfassung der Lichtbedingungen	10
<b>2.4</b>	<b>Bewegungsaktivität</b>	<b>11</b>
2.4.1	Erfassung der Bewegungsaktivität	11
<b>2.5</b>	<b>Berechnung der periodischen Parameter</b>	<b>14</b>
2.5.1	Periodenlänge ( $\tau$ )	14
2.5.2	Synchronisation	16
2.5.3	Rhythmusstabilität	16
<b>2.6</b>	<b>Telemetrie</b>	<b>18</b>
2.6.1	Generelle Überlegungen	18
2.6.2	Messung der Körpertemperatur	19
2.6.2.1	Körpertemperatur-Sender	19
2.6.2.2	Kalibrierung der Körpertemperatur-Sender	19
2.6.2.3	Erfassung der Körpertemperatur	20
2.6.3	Messung der Herzfrequenz	22
2.6.3.1	Herzfrequenz Transmitter	22
2.6.3.2	Erfassung der Herzfrequenz	23
2.6.4	Implantation der Sender	24
2.6.4.1	Implantation der Körpertemperatursender	24
2.6.4.2	Implantation der Herzfrequenzsender	25
<b>2.7</b>	<b>Kalorimetrie</b>	<b>29</b>
2.7.1	Berechnung des Energieumsatzes mittels der indirekten Kalorimetrie	30
2.7.2	Aufbau des indirekten Kalorimeters	33
2.7.2.1	Küvetten	36
2.7.2.2	Pumpen	37
2.7.2.3	Massenflussmesser	38
2.7.2.4	Flussanzeiger	38
2.7.2.5	Ventile	38
2.7.2.6	Trocknung des Messgases	39
2.7.2.7	Hauptmassenflussmesser	42
2.7.2.8	Volumenmessung	42
2.7.2.9	Korrektur des Massenflussmessers	42
2.7.2.10	Kalibrieren der Massenflussmesser	43
2.7.2.11	Einsatz der Massenflussmesser	47
2.7.2.12	Volumenfehler durch den RQ	49
2.7.3	Gasanalyse	52
2.7.3.1	Kohlendioxidmessung	52
2.7.3.2	Sauerstoffmessung	52
2.7.3.3	Kalibrieren des Gasanalysators	53
2.7.4	Auflösungsvermögen der Anlage	53
2.7.5	Computer	55
2.7.5.1	Hardware	55
2.7.5.2	Software	56
<b>2.8</b>	<b>Aufgenommene physiologische Parameter und Auswertung</b>	<b>58</b>

<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Zwerghamster</b>	<b>59</b>
3.1.1	Bewegungsaktivität	60
3.1.2	Körpertemperatur	61
3.1.3	Sauerstoffverbrauch	62
3.1.4	Respiratorischer Quotient	63
3.1.5	Herzfrequenz	64
<b>3.2</b>	<b>Mäuse</b>	<b>66</b>
3.2.1	Aktivitätsmenge	66
3.2.2	Mitnahmebereich	69
3.2.3	Rhythmusstabilität unter Licht-Dunkel Wechsel	71
3.2.4	After Effects	73
3.2.4.1	Auswirkungen auf die Periodenlänge	73
3.2.4.2	Auswirkungen auf die Rhythmusstabilität	78
3.2.5	Sauerstoffverbrauch	78
3.2.5.1	Einfluss der Periodenlänge	79
3.2.5.2	Abhängigkeit von $\tau$ im Freilauf	81
3.2.5.3	Einfluss der Rhythmusstabilität	83
3.2.6	Respiratorischer Quotient	84
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>88</b>
<b>4.1</b>	<b>Messungen am Zwerghamster</b>	<b>88</b>
<b>4.2</b>	<b>Messungen an Mäusen</b>	<b>94</b>
4.2.1	Mitnahmebereich	94
4.2.2	After Effects	97
4.2.3	Bewegungsaktivität	100
4.2.4	Sauerstoffverbrauch	103
4.2.5	Respiratorischer Quotient	110
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>121</b>
<b>7.1</b>	<b>Zeitauflösende Darstellung der gemessenen Parameter</b>	<b>122</b>
<b>7.2</b>	<b>Komponenten und Adressen</b>	<b>127</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BpM	Beats per Minute i.e. Schläge pro Minute, 1 BpM = 0,16667 Hz
Cp	Wärmekapazität
DD	Dauerdunkel
EKG	Elektro-Kardio-Gramm
HR	Herzfrequenz
IO-Karte	Input-Output-Karte i.e. Computerkarte zur binären Erfassung von Spannungen (an/aus)
IR	Infrarot
IR Melder	Passive Infrarotmelder i.e. Infrarot Bewegungssensor
K	Konzentration
L:D 8:16	Licht-Dunkel-Wechsel, hier 8 h Licht und 16 h Dunkelheit
LL	Dauerlicht
mA	Milliampere
Mac	Macintosh Computer i.e. Rechner
Mb	Megabyte
PC	Personal Computer i.e. Rechner
RQ	Respiratorischer Quotient
SubD25	25 polige Steckverbindung
Thermistor	Thermo Resistor i.e. temperaturabhängiger elektrischer Widerstand
TTL Signal	Transistor-Transistor-Logik i.e. binäre Codierung von Spannung „0“ = 0 V, „1“ = 5 V
VCO <sub>2</sub>	Volumen des Kohlendioxids
V(DC)	Volt (Gleichstrom)
VO <sub>2</sub>	Volumen des Sauerstoffs
Vol%	Volumenprozent
$\alpha$	alpha i.e. Aktivitätsphase
$\rho$	rho i.e. Ruhephase
$\tau$	tau i.e. Periodenlänge

## 1 Einleitung

Die innere Uhr bestimmt einen Großteil unseres Lebens. Beinahe alle physiologischen Prozesse laufen periodisch ab und werden durch den Rhythmus eines Taktgebers beeinflusst (Aschoff, 1960). Diese interne Zeitmessung weist einige Charakteristika auf. So ist sie in ihrer Periodenlänge stabil, temperaturkompensiert, durch äußere Zeitgeber nachstellbar und somit in der Lage, ohne Informationen von außen ihren Rhythmus beizubehalten. Diese Uhr ist bei allen Lebewesen vorhanden, sie findet sich vom Einzeller (Roenneberg und Merrow, 2001) bis zum hochorganisierten Säuger. Verschiedene Periodenlängen werden unterschieden. Annuale Rhythmen steuern die jahreszeitlichen Anpassungen z.B. von Zwerghamstern (*Phodopus sungorus*) (Steinlechner et al., 1987) und ermöglichen diesen, sich auf ungünstigere Umweltbedingungen vorzubereiten. Lunare Rhythmen finden sich bei Tieren, die etwa auf besondere Gezeitenkonstellationen angewiesen sind. So synchronisiert die Strandmücke (*Clunio spec.*) (Neumann, 1989) ihren Schlüpfrythmus mit der Springtide. Die offensichtlichste Periodenlänge für den Menschen ist zweifellos der Tag, also der circadiane Rhythmus. Dieser beeinflusst beispielsweise den Wach-Schlaf Rhythmus, die Schmerzempfindlichkeit, die Verträglichkeit von Medikamenten oder die Körperkraft (Aschoff, 1978a, b). Wie der Begriff „circadian“ bereits ausdrückt, ist die Periode dieser Uhr nicht genau 24 h, sondern variiert um diesen Wert. Zum Nachstellen der Uhr eignet sich Licht am Besten, es ist der stärkste Zeitgeber (Aschoff et al., 1975). Aus dem Licht-Dunkel Wechsel lässt sich auch die Jahreszeit ableiten.

Diese Information nutzt *Phodopus*, um sich auf den Winter einzustellen. Der Zwerghamster ist gut geeignet, die circadianen Wechselwirkungen verschiedener physiologischer Parameter zu untersuchen. Sinkt die Lichtdauer pro Tag unter einen kritischen Wert (Hoffmann, 1982), so wächst dem Hamster ein dichtes, weißes Fell, er reduziert sein Körpergewicht sowie die Gonaden und verstärkt seine Thermogenesefähigkeit (Heldmaier et al., 1981). Dieses stellt eine Anpassung an die strengen Winter in dem Herkunftsgebiet, den asiatischen Steppen, dar. Dsungarische Zwerghamster halten keinen mehrmonatigen Winterschlaf wie etwa Murmeltiere (Gattung *Marmota*) (Figalla et al., 1973). Allerdings zeigen sie unter Kurztagbedingungen während der Ruhephase häufig eine Tagesschlaflethargie (*daily Torpor*). Diese Verhaltensweise dient der Energieeinsparung (Heldmaier und Ruf, 1992) und ist vergleichbar einem Winterschlaf für nur wenige Stunden. Morgens, zu Beginn der Ruhephase, senken die Hamster ihren Stoffwechsel, der abhängig von der Umgebungstemperatur bis zu

6 ml  $O_2 \cdot g^{-1}h^{-1}$  betragen kann, auf ein wesentlich niedrigeres Niveau von unter 1 ml  $O_2 \cdot g^{-1}h^{-1}$  ab (Heldmaier und Steinlechner, 1981). Die Herzfrequenz fällt mit dem Stoffwechsel von ca. 500  $min^{-1}$  auf etwa 50  $min^{-1}$  ab (Puchalski, 1984). Daraufhin kühlen die Tiere aus und die Körpertemperatur fällt von 37 °C ebenfalls bis auf Werte um 15 °C (Heldmaier und Steinlechner, 1981 sowie Ruf, 1991) ab. Vor Beginn der Aktivitätsphase erhöhen die torpiden Hamster ihren Stoffwechsel stark, um wieder auf Normothermie aufzuheizen. Hierbei spielt das braune Fett eine entscheidende Rolle; unterstützt von Muskelzittern. An Kälte akklimatisierte Hamster sind in der Lage, Stoffwechselleistungen von bis zu 15 ml  $O_2 \cdot g^{-1}h^{-1}$  (Heldmaier und Steinlechner, 1981) zu erbringen. Es treten somit binnen kurzer Zeit starke Schwankungen der Aktivität, der Körpertemperatur, des Sauerstoffverbrauchs und des respiratorischen Quotienten sowie der Herzfrequenz auf. Alle diese Änderungen folgen einem circadianen Rhythmus.

Eine Fragestellung, die in dieser Arbeit behandelt werden soll, ist, über einen Zeitraum von mehreren Tagen die genannten Parameter parallel zu messen, um die Wechselwirkungen untereinander und im Kontext mit der Tagesperiodik zu erklären. Dies stellt hohe Anforderungen an die Methodik, da die Hamster nur Torpor zeigen, wenn sie sich sicher und ungestört fühlen. Hinzu kommt die relativ geringe Größe der Tiere. Die Messapparatur soll also von dem Tier möglichst nicht wahrgenommen werden, um die Messergebnisse nicht zu verfälschen. Wechselwirkungen zwischen den Messapparaturen sind im Vorherein ebenfalls nicht auszuschließen und müssen untersucht und gegebenenfalls beseitigt werden. Demgegenüber steht die Forderung, alle genannten Parameter kontinuierlich über mehrere Tage aufzunehmen. Einige Systeme existieren bereits in der Arbeitsgruppe. So ist die Aktivitätsmessung und Körpertemperaturregistrierung bereits etabliert (Ruf und Heldmaier, 1987). Allerdings erlauben bisher die Ergebnisse der Bewegungsaktivitätsmessungen nur relative Aussagen, da die Bewegungssensoren keine absoluten Daten lieferten. Um die Aktivitätsmenge zweier, mit verschiedenen Sensoren gemessener Tiere, vergleichen zu können, müssen Lösungen gefunden werden. Bei der telemetrischen Registrierung der Körpertemperatur ist die Kalibrierung der Sender von Hand sehr zeitaufwändig und monoton. Hier gilt es, die Prozesse zu vereinfachen. Dies könnte über die Einführung oder Weiterentwicklung von Computerprogrammen geleistet werden. Damit ließe sich auch die Erkennung des Signals der Körpertempersender verbessern. Für die kontinuierliche Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxidabgabe der Tiere muss die Methodik der indirekten Kalorimetrie erst noch am Institut eingeführt werden. Die

Anforderung ist, diese Parameter über einen Zeitraum von mehreren Tagen oder Wochen aufnehmen zu können, um Aussagen über die Circadianik machen zu können. Hierzu wird es notwendig sein, eine Messapparatur aufzubauen, die selbständig die Messungen durchführt. Außerdem wird diese Anlage nicht in einem Labor stehen können, sondern muss flexibel und mobil in einem Tierstall arbeiten. Zu entwickeln ist auch eine Vorgehensweise, die Tierkäfige in Messkammern umzubauen und über die geforderte Zeit funktionstüchtig zu halten. Und schließlich darf dieser Aufbau die anderen Messungen nicht stören. Die Methodik der indirekten Kalorimetrie ist ein gängiges Verfahren, um die Stoffwechselleistung zu messen (Jensen et al., 2001). In den zoologischen Instituten, etwa in Marburg (Elvert, 2001) oder Bielefeld, ist das Verfahren auch etabliert. Allerdings handelt es sich dort um stationäre Anlagen in Laboratorien, die im Prinzip für Messungen über einige Stunden ausgelegt sind. Eine Anlage für den Einsatz über lange Zeit in einem Tierhaltungsraum zu entwickeln stellt somit eine Neuerung dar. Der letzte Parameter, die Herzfrequenz, stellt sehr hohe Anforderungen an die zu verwendende Technik (Kramer et al., 2001). Da ein solches System nicht im Institut zu entwickeln sein wird, kommt nur eine Zusammenarbeit mit einem anderen Institut in Frage, an dem diese Technik bereits etabliert ist.

Ein wesentlicher Aspekt war es auch, nicht nur jede dieser Messmethoden zu etablieren, sondern so in eine modular aufgebaute und gleichzeitig mobile Apparatur zu integrieren, dass möglichst alle diese Parameter parallel gemessen werden können, ohne dass sich die einzelnen Komponenten gegenseitig stören. Beispielsweise war eine Problemstellung gleichzeitig den Sauerstoffverbrauch und die Bewegungsaktivität zu messen. Die Registrierung des  $O_2$  Verbrauchs bedingt aber ein Verschließen der Messküvette, die Bewegungssensoren dagegen benötigen ein freies „Sichtfeld“ auf die Tiere. Das alles soll schnell und einfach umzubauen sein. Ein anderer Punkt war, parallel mit zwei Sendern zu arbeiten und dabei eine gegenseitige Störung der Telemetrie zu vermeiden.

Der erste Teil dieser Arbeit soll umfassend auf die erarbeitete Methodik eingehen, da in dieser Promotionsarbeit die Neu- und Weiterentwicklung von Messapparaturen einen breiten Raum eingenommen hat. Dies war notwendig, um die Fragestellungen beantworten zu können. Die Prinzipien und ausgesuchten Detaillösungen sollen erläutert werden. Am Beispiel eines dsungarischen Zwerghamsters unter Kurztagbedingungen soll das Zusammenspiel der gemessenen Parameter untersucht werden.



Die indirekte Kalorimetrie und die Bewegungsaktivitätsregistrierung werden auch im zweiten Teil dieser Arbeit verwendet. Hier soll der Einfluss der Periodenlänge des externen Zeitgebers Licht auf Mäuse getestet werden, deren circadianes System verändert ist.

Die „Mechanik“ der inneren Uhr wurde zuerst von Aschoff (1960) und Pittendrigh (1960) untersucht. Die Funktionsweise wurde zunächst phänomenologisch beschrieben und Begriffe definiert, wie „ $\tau$ “ für die circadiane Periodenlänge des Tieres oder „Zeitgeber“ für den exogenen Taktgeber, der den endogenen Rhythmus synchronisiert. Auch wurde und wird die Uhr bei verschiedenen Tierstämmen untersucht und der Taktgeber anatomisch lokalisiert. Es stellte sich heraus, dass bei Säugern die innere Uhr in den suprachiasmatischen Nuclei (SCN) lokalisiert ist (Moore und Eichler, 1972 sowie Reppert und Weaver, 2002). Die Wege der Informationsverarbeitung und Weiterleitung des circadianen Systems der Säuger sind ebenfalls bekannt (Goldman, 2001). Sehr stark verkürzt dargestellt, wird bei Säugern die Lichtinformation ausschließlich über eigene Rezeptoren in der Retina (Bellingham und Foster, 2002) aufgenommen und über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) dem SCN übermittelt. Dieser steht mit dem Pinealorgan in Verbindung, welches Melatonin als Botenstoff für die Lichtinformation ausschüttet. Der SCN aber steht im Mittelpunkt des Interesses, da hier der Rhythmus generiert wird. Die Mechanismen, die dieses ermöglichen, bestehen aus einer Reihe von positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen auf molekularer Basis in den Zellen des SCN (Reppert und Weaver, 2002). Im Wesentlichen sind daran die Proteine PER, CRY, CLOCK und BMAL1 beteiligt. CLOCK-BMAL1 Heterodimere im Zellkern aktivieren die Transkription von *Per1* bis *Per3* sowie *Cry1* und *Cry2* was zur Produktion der entsprechenden Proteine führt. Mit steigender Konzentration bindet PER an CRY und Kaseinkinase1- $\epsilon$  und gelangt in den Zellkern. Dort wirkt dieser Komplex, zusammen mit CLOCK-BMAL1 Heterodimeren der eigenen Transkription entgegen. Dies stellt eine negative Rückkopplung dar, die periodisch abläuft. An dieser Periodik sind aber noch weitere Faktoren beteiligt; so kann dieses System auf Licht reagieren und wird auf diese Weise synchronisierbar. Bislang sind aber noch nicht alle Mechanismen im Detail aufgeklärt. Die verschiedenen Proteinkomplexe stellen in diesem System Oszillatoren mit eigenen Aufgaben dar. So bindet PER1 an CRY1 und PER2 an CRY2. Im Prinzip würde bereits ein einziger solcher Schwingkreis ausreichen, um eine Rhythmik zu erzeugen. Betrachtet man die Oszillatoren genauer, so unterscheiden sie sich in ihren Eigenschaften. Der *Per1/Cry1* Komplex wird durch Licht beschleunigt und durch Dunkelheit verlangsamt, er wird deshalb als eine Komponente des Morgen-Oszillators angesehen (Daan et al., 2001).

Beim *Per2/Cry2* Komplex verhält es sich genau umgekehrt; er wird als Komponente des Abend-Oszillators angesehen (Daan et al., 2001). Um die Aufgaben der verschiedenen Gene bzw. Proteine im SCN untersuchen zu können, werden Mäuse verwendet, denen das jeweilige Gen fehlt, bzw. so mutiert ist, dass kein funktionelles Protein gebildet werden kann. Diese Tiere werden konstanten Lichtbedingungen (Dauerdunkel) ausgesetzt und aus ihrem Verhalten auf die Rolle des jeweils mutierten Gens geschlossen. Zumeist zeigen sich Veränderungen in der Periodenlänge ( $\tau$ ) der Tiere oder der Rhythmus geht komplett verloren (Albrecht, 2002). Die *Per1* Mutanten beispielsweise haben ein deutlich kürzeres  $\tau$  im Dauerdunkel als Wildtyp Mäuse. Die *Per2* Mutanten werden arhythmisch, wenn man sie im Anschluss an einen L:D 12:12 Rhythmus in Dunkelheit hält, während sie im Dauerlicht nun ein kurzes  $\tau$  zeigen aber einen stabilen Rhythmus haben. (Steinlechner et al., 2002b). Aus den bislang bekannten Befunden lassen sich nun Vorhersagen ableiten. Daan et al. (2001) haben für *Per1* und *Per2* defiziente Tiere Prognosen formuliert. Sie betreffen neben anderen Parametern auch die Auswirkungen des vorausgegangenen Lichtregimes, die sog. „After Effects“. Für die *Per* Mutanten werden nur sehr schwache After Effects postuliert, da diese Tiere mit nur einem Oszillator auskommen müssen und daher nicht die Flexibilität der Wildtypen zeigen sollten.

In der vorliegenden Arbeit soll unter anderem diese These getestet werden. Die Frage ist, ob die Mutanten nicht vielleicht doch über bislang unbekannte Mechanismen verfügen, die es ihnen ermöglichen in ganz anderer Weise zu reagieren? Es wird auch zu klären sein, ob die Reaktionen der verschiedenen Genotypen einheitlich ausfallen oder sich deutlich unterscheiden. Ebenso soll der Befund der in Dauerdunkel arhythmischen *Per2* Mutanten überprüft werden. Die Tiere wurden nicht sofort arhythmisch, sondern erst nach einer gewissen Zeit. Wie ist in diesem Zusammenhang der stabile Rhythmus im Dauerlicht zu verstehen? Gibt es Konstellationen, unter denen die *Per2* Mutanten auch im Dauerdunkel rhythmisch bleiben?

Schließlich soll noch eine weitere Fragestellung beantwortet werden. Bei Messungen der Periodenlänge von Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) war ein Tier aufgefallen, dessen  $\tau$  im Freilauf statt der erwarteten 24 h nur 20 h betrug (Ralph und Menaker, 1988). Es zeigte sich, dass dieses Tier eine  $\tau$  Mutante war. Es handelte sich um einen intermediären Erbgang, d.h. die Heterocygoten zeigten eine Periodenlänge von 22,5 h. Mit den Wildtypen waren somit drei Phänotypen vorhanden. Die Frage lautet nun, was für eine Auswirkung diese Mutation auf die pro Tag umgesetzte Energiemenge hat. Tatsächlich finden Oklejewicz et al. (1997)

Effekte der Mutation. Sie haben den Stoffwechsel bei verschiedenen Umgebungstemperaturen gemessen und auf das  $\tau$  der drei Genotypen bezogen. Die 20 h Hamster zeigen, bezogen auf 24 h, einen höheren Stoffwechsel als die Wildtypen. Die Werte der Heterocygoten liegen zwischen den beiden anderen Gruppen. Die Stoffwechselabhängigkeit von der Umgebungstemperatur war dagegen bei allen Gruppen gleich. Schließlich zeigte sich, dass der Energieumsatz pro circadianem Zyklus statistisch nicht zu unterscheiden war. Die 20 h Hamster hatten in 20 h denselben Stoffwechsel wie die Wildtypen über 24 h.

Vorversuche mit *Phodopus*, um ähnliche Versuche an diesen Tieren durchzuführen, hatten eine viel zu geringe Variation des  $\tau$  ergeben. Daher wurde zunächst ein Versuch konzipiert, der nicht das  $\tau$  der Tiere variiert, sondern der die Periodenlänge des externen Zeitgebers verändert (sog. T-Zyklen). Die neueren Befunde an den *Per* mutierten Mäusen mit den stark variierenden Periodenlängen aber gaben dann den Ausschlag. Bei diesen Tieren wechselte das  $\tau$  sehr stark mit den Lichtbedingungen. Steinlechner et al. (2002b) hielten die Mäuse unter konstanten Lichtbedingungen (LL bzw. DD) und variierten in ihren Versuchen die Lichtstärke von Dauerdunkel bis über 300 Lux. Dabei zeigte sich, dass die *Per1* Mäuse mit zunehmender Helligkeit ein längeres  $\tau$  hatten, wogegen die *Per2* Tiere die Tendenz zu kürzeren Zyklen aufwiesen. Dies würde bedeuten, dass diese Mäuse ihre eigene Kontrolle darstellen könnten, da ein und dasselbe Tier verschiedene Zykluslängen zeigen kann. Der Metabolismus bei den variablen, endogenen Periodenlängen eines Tieres könnte verglichen werden. Weiter wäre zu klären, wie diese Tiere auf verschiedene Periodenlängen reagieren würden? Als Zeitgeber bietet sich das Lichtregime an. Die Mäuse werden in einer symmetrischen Photoperiode von L:D 12:12 gehalten. Als Variation könnten die Tiere einer Periodenlänge von z.B. 30 h ausgesetzt werden, indem sie unter L:D 15:15 gehalten würden. Könnten sich die Mäuse damit synchronisieren und wie würde der Rhythmus dann aussehen? Wie wären die After Effects wenn die Tiere im Anschluss unter Dauerdunkel einen Freilauf ihres Rhythmus zeigen. Und wie verhielten sich die Wildtypen? Die Literaturrecherche brachte keine Zitate über eine Variation des externen Zeitgebers, es galt also in diesem Bereich Neuland zu betreten. Die Ergebnisse der Untersuchungen sollen im Folgenden dargestellt werden.

## 2 Material & Methoden

Der Material und Methoden Teil dieser Arbeit geht ausführlich auf die Entwicklung der verwendeten Techniken und Systeme ein, da dies einen wesentlichen Teil der Promotionsarbeit ausgemacht hat. In Auszügen enthält dieser Teil der Arbeit Passagen aus dem Abschlussbericht des Aufbaustudiums „Biomedizinische Technik“ der Hannoverschen Hochschulen (Dernbach, 2001). Dieses Studium wurde mit einem Zertifikat abgeschlossen.

### 2.1 Tiere

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden mit Kleinsäugetern durchgeführt. Diese eignen sich durch ihre gute Handhabbarkeit bei gleichzeitig hoher Aussagekraft als Modellorganismus. Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen tierexperimentellen Eingriffe wurden mit Genehmigung der Bezirksregierung Hannover (Aktenzeichen: 509c-42502-00/387) durchgeführt.

Der beschriebene Aufbau der Kalorimetrie ist für Tiere mit einem Körpergewicht von etwa 20 g bis 150 g vorgesehen. Damit wird der Bereich von Mäusen (z.B. *Mus musculus*) mit etwa 20 g Körpergewicht über Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) oder Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) mit 50 g bis zu Siebenschläfern (*Glis glis*) oder jungen Ratten (*Rattus norvegicus*) mit 150 g Gewicht abgedeckt. Zu beachten ist die Physiologie der jeweiligen Arten. So zeigen Zwerghamster und Siebenschläfer starke jahreszeitliche Anpassungen, indem sie beispielsweise als Reaktion auf die Bedingungen im Winter ihren Stoffwechsel zeitweilig stark verringern. Mäuse und Wüstenrennmäuse zeigen dieses Verhalten für gewöhnlich nicht und werden deshalb auch unter anderen Bedingungen gehalten. Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche wurden an zwei Spezies durchgeführt:

### 2.1.1 Zwerghamster

Der dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*, Pallas) stammt aus den kontinentalen Steppen Sibiriens, der Mongolei und Chinas (Figala et al., 1972). Er erreicht eine Körperlänge von 10 cm bei einem Gewicht 25 bis 50 g. Die Tiere sind nachtaktiv und ernähren sich vorwiegend pflanzlich von Samen und Körnern. Den Tag verbringen die Einzelgänger in selbstgegrabenen Erdhöhlen. Den extremen Lebensraum können die Tiere aufgrund ihrer starken Saisonalität besiedeln. Während der besonders kalten Winter bleiben sie aktiv und passen ihre Physiologie der Kälte an. Durch die dann kurze Photoperiode werden diese Veränderungen hervorgerufen. Das Fell wird länger und dichter und die Farbe wandelt sich von braun zu weiß. Das Körpergewicht sinkt um etwa ein Drittel und die Gonaden werden fast vollständig zurückgebildet. Dahingegen wird das braune Fett, ein Gewebe zur zitterfreien Thermogenese, in der Funktion vergleichbar einem Durchlauferhitzer, effektiver und vermehrt genutzt.

Die verwendeten Tiere stammen aus der institutseigenen Zucht und waren alle älter als fünf Monate und somit adult. Es wurden männliche und weibliche Tiere verwendet, da unter Kurztagbedingungen keine Einflüsse durch die Gonaden erwartet werden können.

### 2.1.2 Mäuse

Bei den in den Versuchen eingesetzten Mäusen (*Mus musculus*) handelte es sich um männliche Tiere mit einer *Knockout* des *mPer1* Gen (B6.129S5-Per1<sup>Brdm1</sup>) bzw. einer funktionellen Deletion des *mPer2* Gens (B6.129S7-Per2<sup>tm1Brd</sup>). Sie haben einen segregierenden Hintergrund von C57BL/6J (B6) und 129SvEvBrd (129S5). Für die Versuche wurden drei Gruppen, Wildtypen, mPer1 und mPer2 von jeweils acht Tieren im Alter von mindestens fünf Monaten verwendet.

Die Tiere wurden von Prof. Dr. Urs Albrecht von der Universität Fribourg / Schweiz zur Verfügung gestellt. Sie stammten vom Max-Planck-Institut für Endokrinologie in Hannover, wo sie gezüchtet wurden. Das Gewicht der Mäuse variierte zwischen 27 g und 44 g.

## **2.2 Haltungsbbedingungen**

Die Zwerghamster und Mäuse werden bei den Messungen einzeln in Makrolon Käfigen Typ 2 (Ehret, Emmendingen) gehalten. Diese haben eine Grundfläche von 352 cm<sup>2</sup> (22 x 16 cm) bei einer Höhe von 14 cm. Auf einer Stirnseite ist bei diesen Käfigen zentrisch eine Öffnung von 25 x 10 mm angebracht. Die Käfige werden mit einer 2 cm starken Schicht aus Einstreu (Animal Bedding Fiber, Altromin) versehen und mit Edelstahl-Drahtaufendeckeln geschlossen. In dem Deckel befindet sich eine Raufe, die Futter (Hamster Breeding Diet bzw. Mouse and Rat Standard Diet, Altromin,) und eine Wasserflasche aufnimmt. Somit haben die Tiere *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser. Alle zwei bis drei Wochen wird die Einstreu erneuert. Hierbei ist es wichtig, einen kleinen Teil der alten Einstreu in den neuen Käfig zu geben und so Effekte durch den Käfigwechsel zu vermindern. Die Tiere werden in Klimakammern (Fa. Weiß, Gießen) bei einer relativen Luftfeuchte von etwa 70 %RH gehalten. Die Temperatur lag bei den Mäusen bei konstant 20 ° bzw. 18 °C bei den Zwerghamstern.

## **2.3 Lichtbedingungen**

Die Lichtbedingungen variieren entsprechend der Fragestellung der Versuche. Langtagbedingungen für Hamster erreicht man durch 16 h Licht und 8 h Dunkelheit (L:D 16:8), dagegen werden 8 h Helligkeit und 16 h Dunkelheit (L:D 8:16) als Kurztag interpretiert. Mäuse, die keine starke saisonale Reaktion auf die Photoperiode zeigen, werden unter symmetrischen Lichtbedingungen L:D 12:12 gehalten. Bei einigen Fragestellungen wurden die Tiere aber auch Dauerlicht (LL) oder Dauerdunkel (DD) ausgesetzt. Als Lichtquelle diente die eingebaute Beleuchtung der Klimakammer. Hier sind in der Decke Leuchtstoffröhren (12 x Leuchtstoffröhren L 36W/39, Osram) eingebaut, die in 1 m Abstand von der Decke eine Helligkeit von 3000 Lux erzeugen. Im Dunkel, d.h. weniger als 0,5 Lux, ermöglicht eine schwache Rotlichtbirne (230V, PF712E\*9C, Philips) die Orientierung, da bei Dauerdunkelversuchen über mehrere Wochen die Tiere auch versorgt werden müssen.

Bei Photoperioden, die eine 24 h Periodizität haben, ist es möglich, die vorhandene mechanische Zeitschaltuhr der Klimakammerbeleuchtung zu verwenden. Bei einem Großteil der hier vorgestellten Versuche waren aber abweichende Periodizitäten gefordert. Um dieses Problem zu lösen, kam ein selbstentwickeltes Programm (QuickBasic7.0, Microsoft) zum Einsatz. Es nutzt die freien Kanäle der Relaiskarte des Kalorimeters (siehe 2.7.2.5 Ventile),

um die Zeitschaltuhr der Klimakammer zu simulieren. Die mechanische Uhr wird entfernt und deren Anschlüsse an der Klimakammer mit den, durch den Rechner ansteuerbaren, Relais verbunden. Mit Kenntnis der Codierung und Belegung der Kontakte sind alle denkbaren Photoperioden per Computer zu simulieren.

### **2.3.1 Verwendete Lichtbedingungen**

In den hier vorgestellten Versuchen wurden die Hamster unter Kurztagbedingungen, also L:D 8:16 gehalten d.h. 8 h Licht gefolgt von 16 h Dunkelheit. Die Hamster waren diesen Lichtbedingungen bereits seit mindestens acht Wochen ausgesetzt und somit an den Kurztag adaptiert.

Die Mäuse wurden unter verschiedenen Periodenlängen gehalten. Realisiert wurden Photoperioden mit einer Dauer von 19 h bis 30 h. Die Aufteilung von Licht zu Dunkelheit war in allen Fällen symmetrisch. So wurde beispielsweise ein 28 h Tag durch L:D 14:14 gebildet. Dämmerungen wurden nicht simuliert. Die Tiere waren zeitlebens unter L:D 12:12 gehalten worden als die Versuche begannen. Die Mäuse wurden folgenden Lichtbedingungen ausgesetzt: Dauerlicht (LL), Dauerdunkel (DD) und Periodenlängen von 19, 21, 22,5, 24, 26, 28 und 30 h. Diese Bedingungen wurden für mindestens zwei Wochen aufrechterhalten, jeweils im Anschluss wurde für mindestens 10 Tage Dauerdunkel eingestellt, um die After Effects aufnehmen zu können. Die Reihenfolge der Periodenlängen war nicht sortiert sondern erfolgte zufällig.

### **2.3.2 Erfassung der Lichtbedingungen**

Als Zeitgeber wurde in den Versuchen ausschließlich der Wechsel von Licht zu Dunkelheit verwendet. Dieser Lichtwechsel wurde über eine Zeitschaltuhr oder einen Rechner gesteuert. Es waren somit die „Sollwerte“ des Lichtregimes bekannt. Da aber bereits ein kurzer Lichtpuls zu einem ungünstigen Zeitpunkt gravierenden Einfluss auf das Verhalten der Tiere hat, war die Erfassung der Lichtbedingungen notwendig. Realisiert wurde dies mit Hilfe von Licht-Spannungs-Wandlern (Licht-Spannungs-Wandler, Conrad Electronic, Hirschaid). Ein Photowiderstand ändert seinen Wert mit der Beleuchtungsstärke und kann somit als Schalter eingesetzt werden. Diese werden, wie die Bewegungssensoren (2.4.1 Erfassung der Bewegungsaktivität), über drei Kontakte an einen beliebigen Kanal der Verteilerdosen der

Aktivitätsregistrierung angeschlossen und der entsprechende Kanal in dem Aktivitätsregistrierungsprogramm eingetragen. Die Versorgungsspannung von fünf Volt der Bewegungsmelder wird über einen Kontakt auf diesen Widerstand gegeben, der zweite stellt die Masse dar, der dritte war die Signalleitung. Geht das Licht an, so verringert sich der Widerstand und die Spannung an dem Signalkontakt steigt an. Der entsprechende Zeitpunkt und die Richtung des Lichtwechsels werden in eine eigne Datei geschrieben. So ist eine kontinuierliche Überwachung des Lichtregimes möglich.

## **2.4 Bewegungsaktivität**

Die kontinuierliche Registrierung der Bewegungsaktivität über den Tag ist eine einfache und schonende Methode die Rhythmik eines Tieres zu bestimmen. Sie erlaubt sehr detaillierte Aussagen und ist in vielen Fällen bereits ausreichend, so dass keine weiteren u. U. belastenderen und aufwändigeren Methoden zum Einsatz kommen müssen. Wichtiges Ziel ist auch hier, den Einfluss der Messung auf die Tiere so weit wie möglich ausschließen zu können. Passive Infrarotmelder (IR Melder) bieten eine besonders gute und relativ günstige Möglichkeit, die Bewegungsaktivität eines Tieres zu registrieren. Diese Methode ist nichtinvasiv und arbeitet berührungsfrei. Sie erlaubt kontinuierliche und vergleichbare Messungen, die auch bei kompletter Dunkelheit möglich sind. Die Sensoren können oberhalb des Tierkäfigs installiert werden und sind klein genug, um keine Abschattung zu verursachen. Somit kann ein Einfluss auf die Tiere durch die Registrierung der Bewegungsaktivität ausgeschlossen werden.

### **2.4.1 Erfassung der Bewegungsaktivität**

Die Bewegungsaktivität wird mit passiven Infrarotmeldern (PIR-Sensormodul, Conrad) aufgenommen und über eine Input/Output (IO) Karte (PIO 48 II, Conrad) an einen Rechner weitergeleitet. Mit diesem wird die Aktivität registriert und abgespeichert.

Auf Platinen aufgebaute passive Infrarotmelder werden als "Schalter" verwendet. Bei Bewegungsaktivität schließen sie, bleiben für ca. drei Sekunden geschlossen, um dann über mehrere Schaltvorgänge wieder zu öffnen. Ist zu diesem Zeitpunkt wieder Aktivität vorhanden, schließen sie erneut. Die Sensoren werden über drei Kontakte angeschlossen, einer



für die Stromversorgung (5 V(DC), 1 mA), einer für Masse und ein Kontakt für das Signal. Wird Aktivität registriert, liegen auf dieser Signalleitung 4,5 V, die als Signal an einen Rechner gegeben werden. Diese Module werden in U-förmigen Haltern aus Acrylglas befestigt (Abbildung 1) und haben eine Größe von 40 x 37 x 28 mm (L x B x H). Sie dienen gleichzeitig als Schutz für die Platinen, Zugentlastung für das Kabel und seitliche Abschirmung des Sensors. Über ein abgeschirmtes zweiadriges Kabel (Steuerleitung, Conrad) wird das Sensormodul an einen Verteiler angeschlossen. Ein zuvor erprobter Aufbau ohne abgeschirmte Kabel hat zu starken Störungen bis zum Ausfall des Rechners geführt.

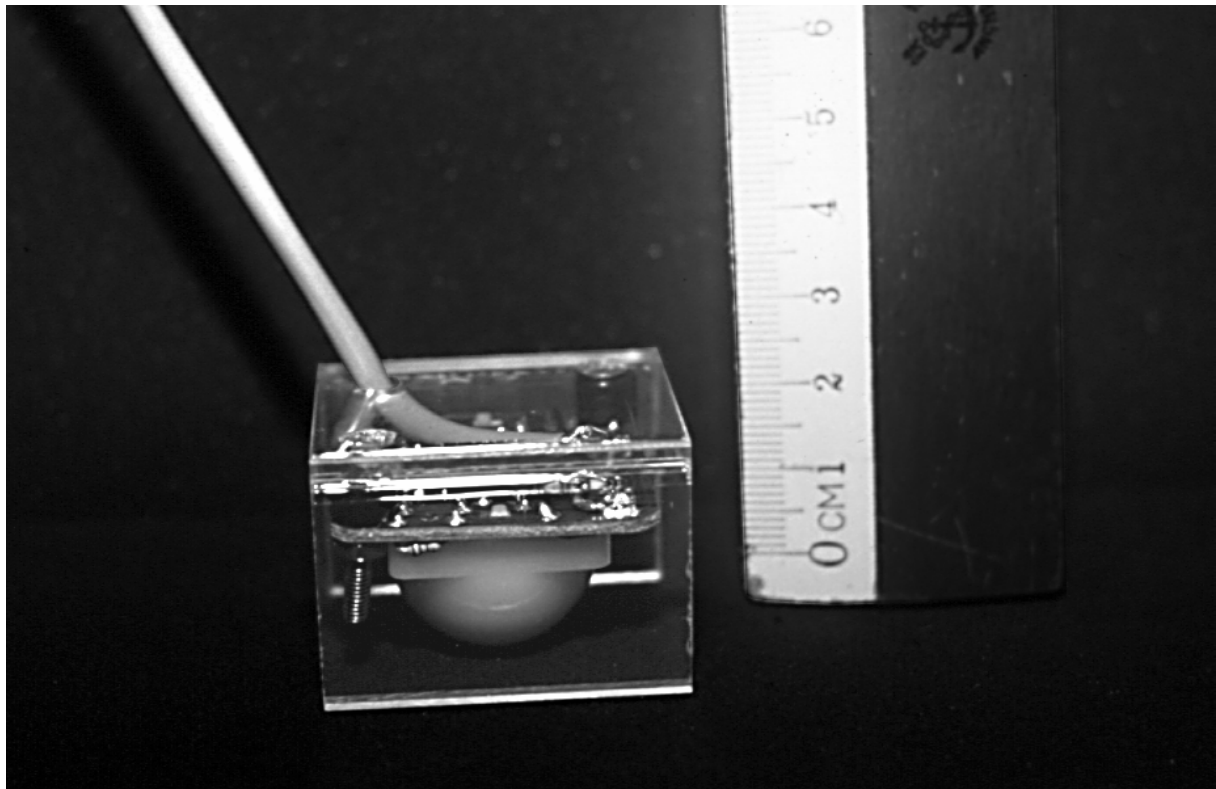


Abbildung 1: Passiver Infrarot Bewegungsmelder. Die Platine wird durch ein Acrylglasprofil geschützt, das auch als Abschirmung und Befestigungsstelle dient. Platziert wird der Sensor über dem Käfig.

Die Abschirmung des Kabels wird als Masseleitung verwendet, während die beiden Adern die Stromversorgung und die Signalleitung führen. Die Verteiler sind für die Aufnahme von jeweils acht Sensoren ausgelegt. Sie tragen Schraubverbindungen für den Anschluss der Steuerleitungen. Der Einsatz von Steckern hat sich als zu fehleranfällig erwiesen, weshalb auf Schraub-Klemmverbindungen ausgewichen wurde. Über eine zehndrige ebenfalls abgeschirmte Steuerleitung ist der Verteiler mit dem Eingang einer Input/Output-Karte (IO-Karte) verbunden. Diese registriert die anliegende Spannung als binäres Signal (an/aus). Die Stromversorgung der Sensormodule und die acht Signalleitungen sind in diesem Kabel

geführt, um den Aufbau möglichst übersichtlich zu halten. Die Abschirmung wird an beiden Enden mit dem Massekabel verbunden, um einen beidseitigen Abschluss zu erreichen. Die Stromversorgung der Sensoren wird über einen separaten Anschluss auf der IO-Karte und somit über das Netzteil des Rechners realisiert. Dies ist aufgrund der geringen Stromaufnahme von 1 mA pro Sensor möglich und erlaubt es, auf ein zusätzliches Netzteil zu verzichten. Die 4,5 V der durchgeschalteten Sensoren können direkt als TTL Signal verwendet werden.

Die nominale TTL Spannung liegt zwar bei 5 V, jedoch ist ab mehr als 2,4 V der Zustand „1“ definiert und unter 0,8 V der Zustand „0“. Der Bereich zwischen 0,8 V und 2,4 V ist nicht definiert, weshalb hier zwischen „0“ und „1“ hin- und hergeschaltet wird. Die Signalleitungen werden über SubD25 Stecker mit der IO-Karte verbunden. Diese verfügt über zwei SubD25 Buchsen und erlaubt daher bis zu 48 Kanäle anzuschließen. Über zwei IC 8255 wird hier das Spannungssignal der einzelnen Eingänge als TTL Signal interpretiert und der Zustand des jeweiligen Kanals als „0“ bzw. „1“ definiert. Um Störimpulse, beispielsweise durch benachbarte Kanäle zu verhindern, kommen „Pull-down“ Widerstände zum Einsatz. Diese werden parallel zur Signalleitung zwischen Masse und Eingang der Karte gelegt. In den Aktivitätssensoren sind sie bereits integriert. Ein QuickBasic Programm fragt die Eingänge iterativ ab und registriert das Umschalten von Zustand „0“ auf „1“, wenn ein Sensorsignal anliegt. Für den betreffenden Kanal wird daraufhin ein Zähler um eins erhöht. Weiterhin wird der Eingang für einen bestimmbaren Zeitraum, der länger als die jeweilige „Todzeit“ der Sensoren und das anschließende undefinierte Verhalten gewählt wird, nicht mehr abgefragt. Dadurch werden Mehrfachzählungen verhindert, die auftreten können, wenn die Spannung am Eingang der Karte im undefinierten Bereich zwischen 0,8 und 2,4 V liegen sollte (Abbildung 2). Der wesentliche Vorteil dieser Technik ist, dass die Bewegungsmelder untereinander vergleichbar werden. Die Sensoren variieren hauptsächlich in ihrer jeweiligen „Todzeit“. Diese Ungenauigkeit wird durch die, per Software erzwungene gemeinsame Todzeit eliminiert und es können vergleichbare Aktivitätsmessungen angestellt werden.

Die Anzahl der Schaltungen pro Kanal in einem definierbaren Zeitraum (ein bis sechs Minuten) sind ein Maß für die Bewegungsaktivität. Sie werden zusammen mit dem entsprechenden Zeitraum sequentiell abgespeichert. Die Anzahl der Schaltungen pro Intervall dient als Maß für die Bewegungsaktivität.

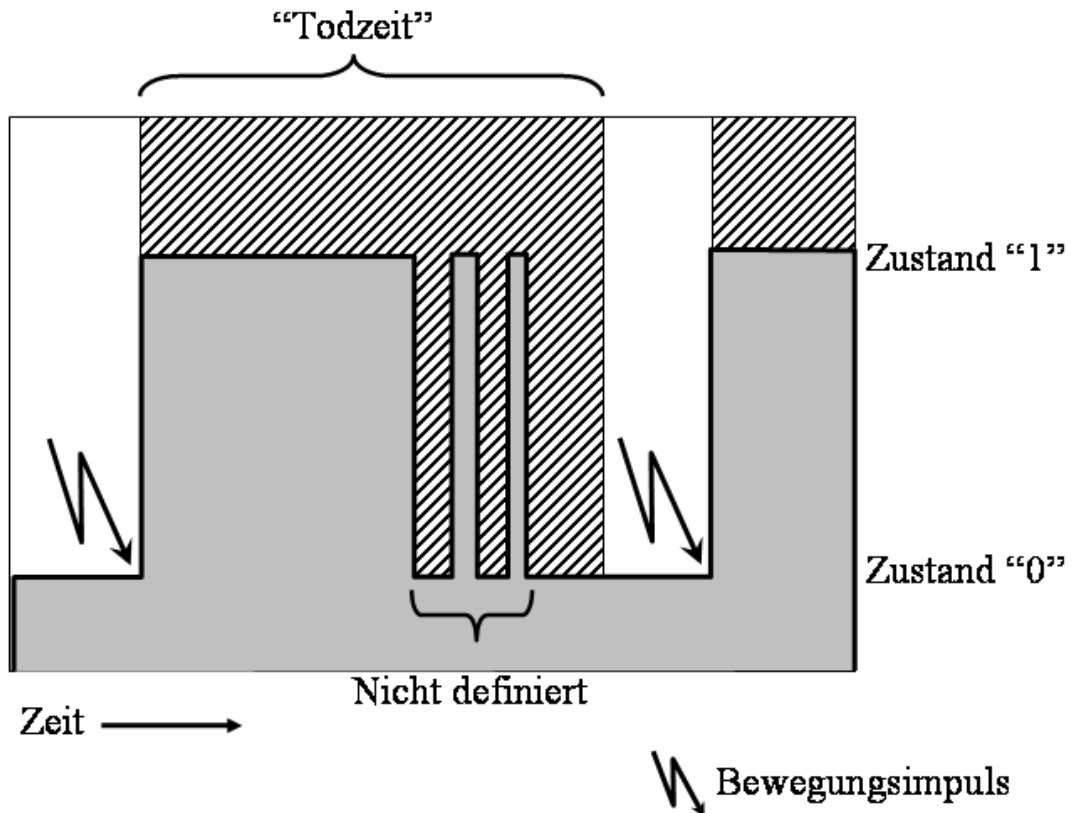


Abbildung 2: Verarbeitung des Signals der Bewegungsmelder. Durch einen Bewegungsimpuls wird von Zustand „0“ auf Zustand „1“ umgeschaltet. Die Software registriert den Schaltvorgang und fragt den Bewegungsmelder für eine definierte Zeit, die Todzeit, nicht mehr ab. So werden Mehrfachzählungen im nicht definierten Bereich vermieden und die Sensoren untereinander vergleichbar.

## 2.5 Berechnung der periodischen Parameter

Die periodischen Parameter wurden anhand der Aktivitätsdaten berechnet. Diese Datengrundlage wurde gewählt, da die Aktivität kontinuierlich und bei allen Tieren in gleicher Weise aufgenommen worden war und somit ideale Bedingungen für eine Vergleichbarkeit gegeben waren. Zwei Parameter wurden berechnet:

### 2.5.1 Periodenlänge ( $\tau$ )

Die Periodenlänge ( $\tau$ ) der einzelnen Tiere unter den verschiedenen Bedingungen wurde berechnet, indem ein Zeitabschnitt mit gleich bleibenden Umgebungsbedingungen z.B. L:D 11,25:11,25 herangezogen wurde. Abbildung 3 zeigt als Doppelplot das Aktogramm

einer *mPer1* defizienten Maus unter L:D 11,25:11,25 und anschließend unter Dauerdunkel. Für die Bestimmung der Periodenlänge ( $\tau$ ) des Tieres unter L:D 11,25:11,25 wurde der gekennzeichnete, obere Bereich verwendet, für die Bestimmung des  $\tau$  unter Dauerdunkel entsprechend der anschließende Zeitraum. Die Bestimmung des  $\tau$  wurde mit Hilfe einer Periodogrammanalyse (Sokolove und Bushell, 1978) angestellt. Vereinfacht dargestellt wird hierbei die Aktivität zu den einzelnen Zeitpunkten hintereinander in einen Datensatz geschrieben. Diesen Datensatz zerschneidet man nun in jeweils gleichlange Stücke, z.B. eine Stunde, und legt sie „hintereinander“. Dieser Vorgang wird mit variierender Länge der Teilstücke wiederholt. Die Länge, bei der sich das deutlichste Profil abzeichnet, bezeichnet nun die Periodenlänge des getesteten Datensatzes. Graphisch umgesetzt wird dieser Test in einem Periodogramm, wie es in Abbildung 4 dargestellt ist.

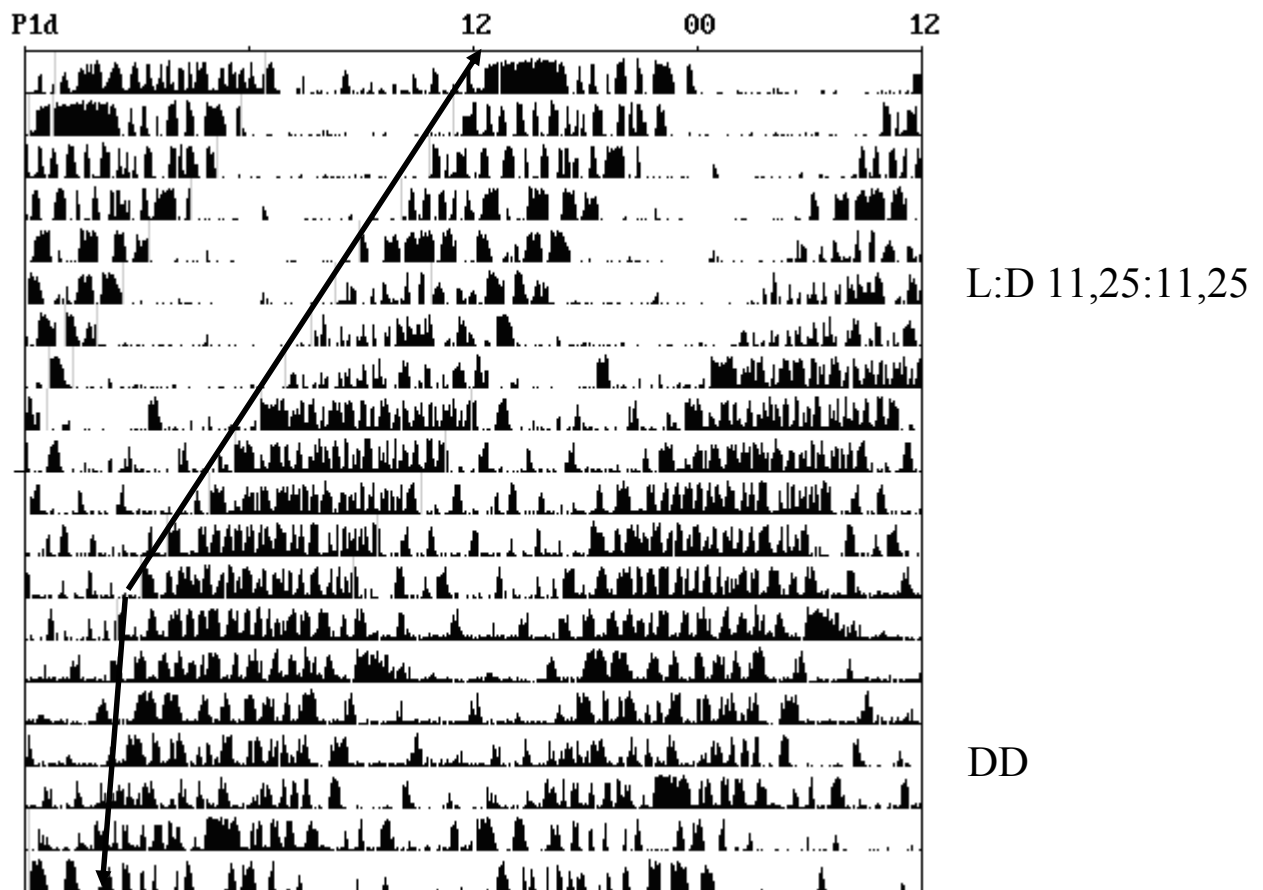


Abbildung 3: Aktogramm (dargestellt als Doppelplot über 20 Tage) einer *mPer1* defizienten Maus unter L:D 11,25:11,25 und anschließendem Dauerdunkel. Die schwarzen Striche bezeichnen die Zeiträume, die für die Bestimmung der Periodenlänge  $\tau$  verwendet wurden. Deutlich ist die unterschiedliche Steigung zu erkennen.

### 2.5.2 Synchronisation

Anhand der Aktogramme wurde überprüft, ob die Tiere sich auf den gegebenen Licht-Dunkel Wechsel eingestellt hatten und damit synchronisiert waren (*Entrainment*). Dies lies sich feststellen, indem der Verlauf des Rhythmus im Dauerdunkel (Freilauf) mit dem vorausgegangenen Rhythmusprofil verglichen wurde. Abbildung 3 zeigt den Übergang vom synchronisierten Rhythmus zum Freilauf unter Dauerdunkel. Die Fortsetzung des Aktivitätsmusters im Freilauf am selben Zeitpunkt und in ähnlicher Form wie unter synchronisiertem Rhythmus zeigt, ob ein Tier synchronisiert war. Hätte der externe Rhythmus des Lichts eine innere Periodik überlagert (*Masking*), so würde diese innere Rhythmik im Freilauf sichtbar (Mrosovsky, 1999). Im angegebenen Beispiel ist das Tier auf den externen Rhythmus synchronisiert gewesen.

### 2.5.3 Rhythmusstabilität

Neben der Information der Periodenlänge ( $\tau$ ) des Tieres in dem betrachteten Zeitraum enthält das Periodogramm noch Informationen über die Stabilität des Rhythmus. Dieser Parameter wurde ebenfalls berücksichtigt, da hier deutliche Unterschiede festzustellen waren, deren Einfluss untersucht werden sollte. Betrachtet man das Aktogramm in Abbildung 3, so fällt auf, dass das Muster des Rhythmus während des Licht-Dunkel Wechsels im oberen Teil des Doppelplots geordneter und klarer aussieht als im unteren Teil. Dort war das Tier im Dauerdunkel und somit im Freilauf. Der Rhythmus zeichnet sich nicht so klar ab, es fehlen klare Zeitpunkte des Aktivitätsbeginns (Onset) und die Verteilung der Aktivität über die Zeit ist disperser. Eine Periodizität ist aber auch mit bloßem Auge zu erkennen. Die Tiere zeigen z.T. sehr verschiedene Muster in ihrem Rhythmus. So ist die Verteilung, der Beginn oder das Ende der Aktivität unterschiedlich. Ältere Tiere zeigen beispielsweise häufiger ein stärker fragmentiertes Muster als junge Tiere. Um ein objektives Maß für die Stabilität des Rhythmus zu bekommen, wurde die Periodogrammanalyse (Sokolove und Bushell, 1978) verwendet:

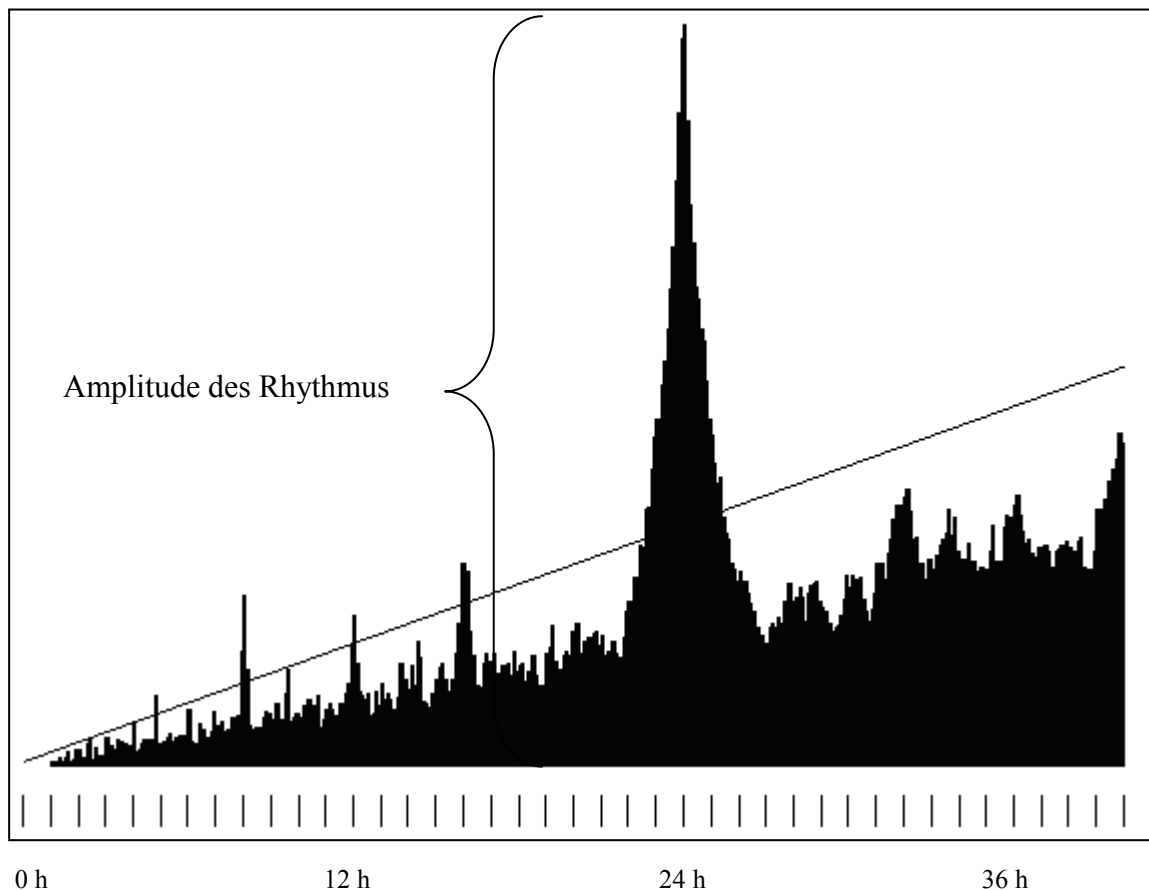


Abbildung 4: Periodogramm der Aktivität einer Maus unter L:D 12:12. Deutlich ist das Maximum bei 24 h zu erkennen. Der nach rechts ansteigende Strich stellt die Signifikanzgrenze dar. Der Zahlenwert des Maximums wird für die Berechnung der Rhythmusstabilität herangezogen.

Um ein Maß für die Rhythmusstabilität zu finden, wurde der erhaltene Zahlenwert des Maximums der Rhythmusamplitude aus der Berechnung des Periodogramms herangezogen. Der Maximalwert wurde durch die Anzahl der in die Berechnung eingegangenen Tage dividiert und so ein Maß für die Rhythmusstabilität gefunden. Dieses wurde als Grundlage für den Vergleich der Rhythmusstabilität der verschiedenen Genotypen unter den Versuchsbedingungen herangezogen.

$$\text{Rhythmusstabilität} = \text{Rhythmusamplitude} / \text{Anzahl Tage}$$

Gleichung 1

## 2.6 Telemetrie

### 2.6.1 Generelle Überlegungen

Die Möglichkeit der berührungslosen und kontinuierlichen Datenübertragung ist der Vorteil der Telemetrie. Das Verhalten von zu untersuchenden Tieren wird nicht durch anhängende Drähte oder Berührungen wie z.B. bei der rektalen Temperaturmessung verfälscht. Die Messwerte werden von Sendern aufgenommen und ermöglichen eine kontinuierliche und automatisierbare Datenerfassung bei geringstmöglicher Beeinflussung der Tiere.

Diesen Vorteilen stehen aber Nachteile gegenüber. So müssen die Sender zumeist implantiert werden, was einen operativen Eingriff bedeutet und, bedingt durch eine endliche Batteriekapazität, haben aktive Transmitter eine begrenzte Funktionsdauer. Weiterhin muss auf die Minimierung der Größe und des Gewichtes, sowie die Vermeidung von Abstoßungsreaktionen geachtet werden. So gilt für die Besenderung von Tieren im Freiland die Faustregel, dass das Sendergewicht nicht mehr als 5 % des Körpergewichts betragen soll.

Der Problematik der begrenzten Funktionsdauer der Batterien begegnen wir mit einer Erhöhung der Kapazität bzw. einem Schalter, der den Sender abschaltet, wenn er nicht benötigt wird. Die Größe und Form der Implantate ist in den letzten Jahren, bedingt durch die Fortschritte in der Technik, kleiner und kompakter geworden, wie es die Maße unserer Sender widerspiegeln. Durch die Verwendung von Wachs und Silikon als Überzug treten nur wenig Probleme hinsichtlich der Verträglichkeit auf. Hier finden wir spezifische Unterschiede. Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) und Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) zeigen keinerlei Reaktionen auf die Implantate. Labormäuse (*Mus musculus*) reagieren zumeist mit einer fibrösen Einkapselung des Fremdkörpers, wenn der wachsüberzogene Körpertempersender über längere Zeit im Tier verbleibt. Dies könnte bei einer Explantation zu Blutungen führen, weshalb diese Sender möglichst post mortem wieder entnommen werden. Somit ist eine telemetrische Körpertemperaturmessung über lange Zeit problematisch, da sie einen mehrfachen Austausch der Sender bedeutet. In den hier dargestellten Versuchen wurde daher auf die Registrierung der Körpertemperatur bei Mäusen verzichtet. Die Implantation wird unter Vollnarkose durchgeführt und stellt eine, im Verhältnis zum zu erwartenden Nutzen, nur mäßige Belastung für die Tiere dar. Die Tiere zeigen bereits wenige Stunden nach dem Eingriff wieder normale Aktivitätsmuster. Spätestens am dritten Tag hat sich auch die Körpertemperatur normalisiert.

## 2.6.2 Messung der Körpertemperatur

### 2.6.2.1 Körpertemperatur-Sender

Die Körperkerntemperatur ( $T_b$ ) der Tiere wird telemetrisch gemessen. Hierzu werden einfach aufgebaute, kommerzielle Miniatursender verwendet (Modelle X, MINI-MITTER). Die Sender bestehen aus einem Kondensator, der über einen Thermistor geladen wird. Diese Komponenten sind innerhalb einer Spule, über die der Ladungsausgleich geschieht, sehr kompakt platziert. Durch den Potenzialausgleich wird ein kurzes (1 ms), sehr breitbandiges Signal im Bereich zwischen 10 und 100 kHz erzeugt. Die Temperaturmessung ist somit durch den zeitlichen Abstand zwischen zwei Signalen codiert und erlaubt eine Auflösung von 0,1 °C. Dieser Aufbau ist in Kunstharz eingegossen und mit zwei Drahtelektroden versehen, die zum Anschluss einer Batterie dienen. Die Energieversorgung erfolgt über eine Knopfzelle (Silberoxid, Typ 319), die für eine Betriebsdauer von bis zu drei Monaten Betrieb ausreicht. Die vergossene Spule und die Batterie werden in einer Polyethylenkapsel eingebettet und schließlich mit einer Wachsmischung (50 % Paraffin, 50 % Bienenwachs) überzogen, um die Sender gegen Körperflüssigkeiten abzudichten. Die so für die Implantation vorbereiteten Sender weisen keine Kanten mehr auf, wodurch eine mechanische Reizung verhindert wird und verursacht durch den Wachsüberzug auch keine Abstoßungsreaktion im Tier. Fertig wiegen die tönchenförmigen Transmitter 1,1 bis 1,3 g und sind ca. 13 mm lang bei 9 mm Durchmesser.

### 2.6.2.2 Kalibrierung der Körpertemperatur-Sender

Bedingt durch die Variabilität von Parametern wie Kontaktfläche oder Grad der Oxidation an den Kontaktflächen zwischen Batterie und Sender ist es notwendig, jeden fertigen Transmitter vor der Implantation erneut zu kalibrieren. Dies geschieht mit Hilfe eines Eichthermometers in einem temperierten Becken, gefüllt mit entmineralisiertem Wasser. In Schritten von 3 °C wird die Temperatur von 20 °C bis 40 °C erhöht. Nach jeder Temperaturerhöhung werden ca. 15 min abgewartet, bis die Transmitter gleichmäßig temperiert sind. Nun wird der zeitliche Abstand ( $t$ ) zwischen zwei aufeinander folgenden Sendersignalen gemessen und der jeweiligen Wassertemperatur zugeordnet. Aus der so gewonnenen Messreihe lässt sich ein logarithmischer Zusammenhang zwischen Temperatur ( $T$ ) und dem Signalabstand ( $t$ ) entsprechend Gleichung 1 darstellen:



$$T [^{\circ}\text{C}] = A - B \cdot \ln(t/t_0)$$

Gleichung 2

Für  $t_0$  kann z.B. 1 ms eingesetzt werden.

Um den Arbeitsaufwand während des Kalibrierens zu verringern und die Genauigkeit zu erhöhen, werden die Signale per Rechner aufgenommen. Der zeitliche Abstand wird mit Hilfe eines selbstentwickelten Programms analog zur späteren Datenaufnahme bestimmt. Aus diesen Informationen und der entsprechenden Temperatur werden die Parameter A und B errechnet. Abbildung 5 zeigt die so ermittelten Kennlinien von drei Sendern.

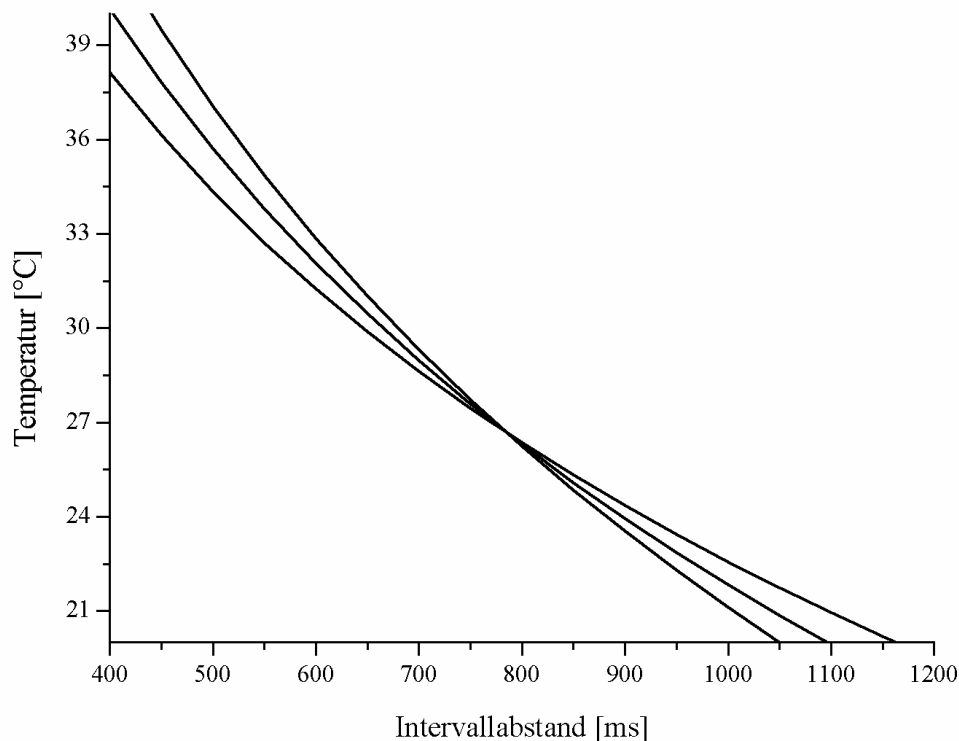


Abbildung 5: Kennlinien von drei Temperatur-Transmittern, ermittelt durch Kalibrieren im Wasserbad.

### 2.6.2.3 Erfassung der Körpertemperatur

Die Körperkerntemperatur ist durch den zeitlichen Abstand zwischen zwei elektromagnetischen Impulsen mit etwa 25 cm Reichweite und etwa 1 ms Dauer im Mittelwellenbereich mit einem Maximum bei 70 kHz codiert. Diese werden mit Taschenradios (UKW/MW-Radio UT-204, Conrad Electronic) aufgenommen, die nahe dem Tierkäfig platziert sind. Die Signale der Sender sind als Klicken im Radio zu hören. Über den

Kopfhörerausgang wird das Signal an eine Analog-Digital-Wandler Karte (16 Kanal 12 Bit A/D-Wandler, Conrad Electronic) in einem PC weitergeleitet. Diese Karte erlaubt es, 16 Kanäle parallel aufzunehmen und das Signal mit 12 Bit in einem Bereich von 0 bis 8,5 Volt aufzulösen, also mit einer Auflösung von 2 mV. Die zeitliche Auflösung hängt vor allem von der Taktfrequenz und dem Bussystem des Rechners sowie der verwendeten Software ab. Da die Frequenzen im zweistelligen MHz Bereich liegen, benötigt z.B. ein Rechner mit 80386 Prozessor und 33 MHz Taktung 2,5 s für die Registrierung von 10.000 Datenpunkten. Die zeitliche Auflösung liegt somit bei 0,25 ms und ist daher ausreichend für das Sendersignal von 1 ms Dauer.

Mit einem eigenen Programm (QuickBasic 7.0, Microsoft) wird die Datenerfassung bewerkstelligt. Die Kanäle werden in Abständen von einer oder sechs Minuten iterativ ausgelesen. Hierzu werden 10.000 konsekutive Spannungswerte an dem jeweiligen Eingang aufgenommen und die dazu benötigte Zeit gemessen. Dadurch ist es möglich, jedem Datenpunkt einen Zeitpunkt zuzuordnen und zeitliche Abstände innerhalb der gemessenen Daten zu bestimmen. Die Transmittersignale erscheinen als Spannungsspitzen über dem Hintergrundrauschen (Abbildung 6).

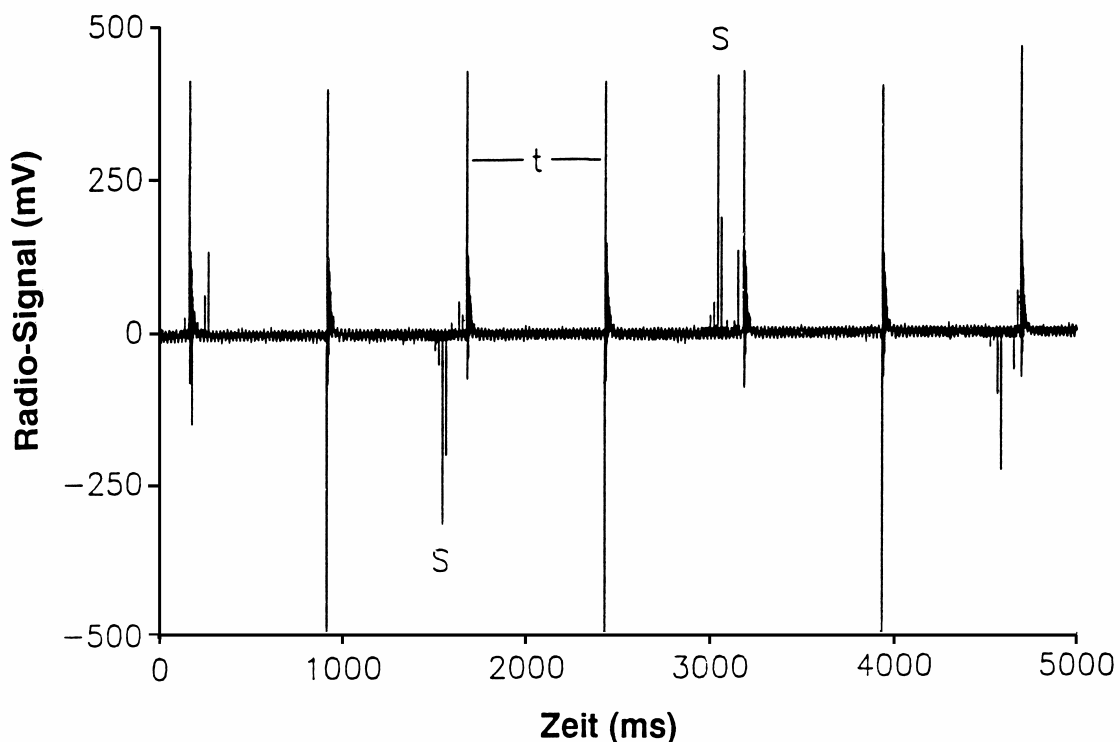


Abbildung 6: Original Temperatur-Transmitter Impulse. Gemessen mit einer A/D-Wandler Karte am Ausgang eines Mittelwellenradios. Die Temperatur berechnet sich aus dem Abstand (t) zwischen zwei Impulsen, wobei Störimpulse (S) berücksichtigt werden müssen. (Aus: Ruf, 1991)

Die Software bestimmt nun den Mittelwert der Daten und der Abweichung aller vorliegenden Messpunkte. Mit Hilfe dieser Angaben wird ein Schwellenwert bestimmt, mit dem potenzielle Sendersignale vom Hintergrundrauschen getrennt werden. Eine Filterfunktion diskriminiert konsekutive Daten, um Mehrfachzählungen eines u. U. etwas längeren Signals zu verhindern. Im Folgenden wird die Zeitkomponente der gefundenen Punkte verwendet, um die jeweilige Intervalldauer zwischen zwei Punkten zu bestimmen. Die ermittelten Messintervalle werden ihrer Häufigkeit nach sortiert. Das häufigste Intervall wird in die entsprechende Körpertemperatur umgerechnet und einer Plausibilitätsprüfung unterworfen. Ergibt sich eine unrealistische Körpertemperatur von z. B. 56 °C, so wird das nächstweniger häufige Intervall zur Berechnung verwendet. Findet sich kein realistischer Wert, so wird die Messung bis zu fünfmal wiederholt.

Die ermittelten Körpertemperaturen und die entsprechenden Uhrzeiten werden nach jeder Messung für jeden Kanal in eine eigene sequenzielle Datei geschrieben. Die Erfassung der Körperkerntemperatur ist somit kontinuierlich, berührungsfrei und automatisiert über einen langen Zeitraum möglich.

### **2.6.3 Messung der Herzfrequenz**

Die Messung der Herzfrequenz erfolgt über die Registrierung der durch den Herzschlag ausgelösten Potenzialdifferenz. In früheren Aufbauten wurde über feine, am Käfigdeckel befestigte Drähte die Herzfrequenz abgeleitet (Puchalski, 1984 sowie Plonait und Büttner, 1984). Bei dieser Methode besteht eine Beeinträchtigung der Tiere durch die „Fesselung“ an die Elektroden und die dauerhafte Penetration der Haut. Eine Registrierung mit einem implantierbaren Transmitter ist deshalb ein erheblicher Fortschritt bei der Messung der Herzfrequenz von Kleinsäugetieren.

#### **2.6.3.1 Herzfrequenz Transmitter**

Zur kontinuierlichen und berührungsfreien Messung der Herzfrequenz werden kommerzielle, aktive Transmitter für kleine Labortiere (TA10EA-F20, Data Sciences, St. Paul, Minnesota, USA) verwendet. Diese implantierbaren Sender bestehen aus einem Analog / Digital-Wandler samt Verstärker und Sendereinheit, einer Batterie, einem Magnetschalter sowie zwei Elektroden. Die gesamte Elektronik ist in Epoxydharz eingegossen, die Einheit mit der Batterie von Silikon ummantelt. Ein zusätzlicher Wachsüberzug wie bei den

Körpertemperatur Sendern ist nicht nötig, da bereits durch das Silikon eine hervorragende Verträglichkeit gegeben ist. Die Sender sind mit 17 x 12 x 7 mm und 3,9 g Gewicht ausreichend kompakt, um in eine Maus von 25 g implantiert zu werden. An der Stirnseite des Transmitters ragen zwei hochflexible, fünf Zentimeter lange Platinelektroden heraus, die bis auf die äußeren Enden mit einem Silikonschlauch elektrisch isoliert sind. Eine Außenantenne ist nicht notwendig, da die Senderreichweite mit 30 cm bereits ausreichend ist. Eine wesentliche Verlängerung der Funktionsdauer auf bis zu 24 Monate ermöglicht der Magnetschalter, mit dem sich der Sender auch im Tier an- und abschalten lässt. Die Sender erfassen die Potenzialdifferenz zwischen den Elektroden und wandeln sie in ein digitales Signal, welches breitbandig im Bereich von 550 kHz gesendet wird und eine Auflösung von 1 ms erlaubt. Eine Kalibrierung der Sender ist nicht erforderlich, da die Potenzialdifferenz lediglich als relatives Signal aufgenommen wird.

### *2.6.3.2 Erfassung der Herzfrequenz*

Das digitale Signal des Herzfrequenzsenders muss empfangen und so aufbereitet werden, dass es mit einem Datenakquisitionsprogramm aufgenommen werden kann. Mittels eines Empfängers (RLA 1020, Data Sciences, St. Paul, Minnesota, USA) in Form eines flachen Kastens von 3 x 7 x 25 cm, der direkt unter einem Tierkäfig platziert wird, werden die Senderdaten aufgenommen. Über einen an den Empfänger angeschlossenen analogen EKG-Adapter (Option RO8, Data Sciences, St. Paul, Minnesota, USA) wurden die Signale wieder in Analogsignale konvertiert und an einen Analog-Digital Wandler (MacLab 4s, ADInstruments, Spechbach) weitergeleitet. Dieser digitalisierte die Signale mit einer Abtastrate von 2 kHz. Über einen SCSI Bus wird dieses System mit einem Rechner (Mac, G3) verbunden. Mittels entsprechender Software (MacLab Chart 3.6/s, ADInstruments, Spechbach) wurden die EKG-Signale abgespeichert und bearbeitet. Die Abtastrate von 2 kHz bietet eine ausreichend hohe Auflösung selbst bei einer maximalen Herzfrequenz von etwa 700 Schlägen pro Minute bei Zwerghamstern. Der Aufbau ermöglicht zwei Sender parallel zu registrieren und die Daten kompakt abzuspeichern. Dies ist notwendig, da eine Aufzeichnung von 16 Stunden mit 2 kHz eine Datei von etwa 100 Mb Größe ergibt. Zur Bestimmung der Herzrate (HR) wurden mittels der verwendeten Software (MacLab Chart 3.6/s, Software-Erweiterung HRV, ADInstruments, Spechbach) die Intervalle zwischen den R-Wellen des aufgezeichneten EKG-Signals in Millisekunden und die instantane Herzrate als Schläge pro Minute (Beats per Minute: BpM) errechnet. Die gesamte Ausrüstung zur telemetrischen

Erfassung der Herzfrequenz wurde uns im Rahmen einer Zusammenarbeit von Dr. Oliver Stiedl aus der Abteilung Molekulare Neuroendokrinologie von Prof. Dr. Spiess am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen zur Verfügung gestellt.

#### **2.6.4 Implantation der Sender**

Ziel der Implantation der Transmitter ist, möglichst schonend und schnell die Sender so zu platzieren, dass eine dauerhafte Funktion gewährleistet ist. Als besten Zeitpunkt für den Eingriff hat sich der Vormittag herausgestellt, dann beginnt für die nachtaktiven Nager die Ruhephase und die Narkose bereitet wenig Probleme. Es wurden verschiedene Narkosen verwendet.

Eine Implantation von zwei Sendern gleichzeitig stellt ein Novum dar, welches durch die besondere Biologie des Zwerghamsters (*Phodopus sungorus*) notwendig und möglich geworden ist. Während des Torpors kann die Körperkerntemperatur 20 °C und weniger erreichen, begleitet von einer deutlich erniedrigten Herzfrequenz. Die potenzielle Möglichkeit, die Körpertemperatur mittels des Herzfrequenzsenders aufzunehmen, ist durch dessen eingeschränkten Messbereich nicht nutzbar. Deshalb kommt ein zusätzlicher Temperatursender zum Einsatz. Unsere positiven Erfahrungen mit den Körpertemperatursendern und die Anatomie von *Phodopus*, der ausreichend Volumenvariabilität im Bauchraum aufweist, ließen dieses Vorgehen möglich erscheinen. Beide Implantate werden intraperitoneal platziert, wodurch sie während einer einzigen Operation appliziert werden können. Einer der Sender wird fixiert, der andere liegt frei im Bauchraum, wodurch Quetschungen und Druckstellen vermieden werden. Die Frage, ob sich die Signale der Transmitter trennen lassen, obwohl beide in überlappenden Frequenzbereichen senden, wurde in Vorversuchen positiv beantwortet. Die Signalstruktur stellt sich als ausreichend unterschiedlich dar, um mit beiden Systemen parallel arbeiten zu können. Insgesamt wurden 12 Zwerghamster mit einem Gewicht zwischen 30 und 48 g besendert.

##### **2.6.4.1 Implantation der Körpertemperatursender**

Für die Implantation von Temperatursendern ist die Narkose mit einer intraperitonealen Injektion von 60 mg Pentobarbital pro kg Körpergewicht eingeleitet worden. Eine Konzentration von 12 mg Narkotikum pro 1 ml physiologischer Kochsalzlösung wurde als Injektionslösung verwendet. Nach etwa 15 Minuten tritt eine ausreichende analgetische,

anästhetische und relaxierende Wirkung ein. Alternativ besteht die Möglichkeit, die „Hellabrunner Mischung“ zu verwenden, eine Kombination aus Ketamin (Ketanest, Parke-Davis, Berlin) dosiert mit 60 mg/kg Körpergewicht und Xylazin (Rompun, Bayer, Leverkusen) in einer Konzentration von 4 mg/kg Körpergewicht, die ebenfalls intraperitoneal injiziert wird. Hierbei geht die relaxierende Wirkung vom Xylazin aus, das eine nur geringe therapeutische Breite aufweist und bei verschiedenen Spezies unterschiedlich stark wirkt. Dementsprechend schwierig ist es, zu dosieren. Diese Narkosen erlauben Eingriffe von maximal 45 bis 60 Minuten. Sind die Tiere narkotisiert, werden sie auf dem Rücken gelagert und die Extremitäten auf der Unterlage fixiert. Der Operationsbereich wird mit einer Schere enthaart und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Für die Implantation wird nun ein etwa 1,5 cm langer Schnitt durch die Haut seitlich am Unterbauch geführt. Das Bauchfell wird ca. 1 cm geöffnet, der Sender nochmals geprüft und dann frei beweglich in den Bauchraum gegeben. Nach einiger Zeit kommt er zumeist unterhalb der Leber zu liegen. Mit zwei Nähten werden schließlich das Bauchfell und die Haut wieder verschlossen. Hierzu verwenden wir resorbierbares Nahtmaterial (Catgut, metric:2, USB: 4/0), wodurch eine weitere Behandlung des Tieres vermieden wird. Vorsorglich wird Penicillinpulver in die Wunde gegeben. Dieser Eingriff nimmt etwa 15 Minuten in Anspruch.

#### *2.6.4.2 Implantation der Herzfrequenzsender*

Die Implantation der Herzfrequenzsender erfolgte am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen in Zusammenarbeit mit Dr. Oliver Stiedl aus der Abteilung Molekulare Neuroendokrinologie von Prof. Dr. Spiess am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen. Bei der Operation wurden die Sender intraperitoneal fixiert und die Elektroden subcutan diagonal verteilt platziert.

Die Platinelektroden wurden vor der Sterilisation auf die richtige Länge zugeschnitten. Die zum rechten Vorderbein führende Elektrode hatte eine Länge von 3 cm, die zum linken Hinterbein ziehende 5 cm. Beide Elektrodenenden wurden auf 7 mm abisoliert und das Schlauchende mit chirurgischem Faden durch einen Knoten verschlossen, um das Eintreten von Flüssigkeit in den Isolationsbereich zu verhindern. Silikonschutzkappen wurden an den Drahtenden der beiden Elektroden mit nicht resorbierbarem chirurgischem Faden befestigt. Die Transmitter wurden daraufhin über Nacht in 2%-igem Glutaraldehyd (Helipur Hplus, Braun, Melsungen) sterilisiert. Direkt vor der Operation wurden sie dreimal für 15 min in steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen.

Für die länger dauernden Implantationen der Herzfrequenzsender wurde eine Inhalationsnarkose verwendet. Mit Hilfe eines Verdampfers (Tabletop research unit, SurgiVet/Anesco, Waukesha, Wisconsin, USA) kann ein Gasgemisch von 0 bis 4 Vol% Isofluran (Forene, Abbot, Wiesbaden) in Sauerstoff erzeugt werden. Über eine Maske wird die Narkose verabreicht (Durchflussrate: 0,5 l/min, 1,5 bis 2,5 Vol% Isofluran). Der Vorteil ist, dass das Narkotikum sehr schnell anflutet und die Narkose über die erforderliche Zeit aufrecht gehalten werden kann. Ebenso schnell lässt die Wirkung wieder nach. Um die Körpertemperatur der Tiere während der Operation nicht zu weit absinken zu lassen, werden sie auf einer auf 37°C temperierten Platte gelagert.

Mit Enthaarungscreme (Pilca, Schwarzkopf, Hamburg) und anschließend mit 70 Vol% Ethanol wird der mediane Abdominalbereich zur Operation vorbereitet. Für die Implantation der Herzfrequenzsender bei Phodopus wird ein 3 cm langer Schnitt unterhalb des Sternums durch Haut und Peritoneum über die Linea alba geführt. Hierbei wird versucht die Abdominaldrüse zu umgehen. Sterile 0,9%-iger Kochsalzlösung wird in regelmäßigen Abständen auf den Operationsbereich gegeben, um ihn feucht zu halten. Subkutan werden mit einer Sonde Kanäle gebildet, durch die später die Elektroden geführt werden. Nun werden die Sender in den Bauchraum gegeben und die Elektroden von innen nach außen durch das Peritoneum geführt. An dem Herzfrequenztransmitter ist ein Kiel ausgebildet, der mit dem Bauchfell vernäht wird. Die eine Elektrode wird nun unterhalb der rechten Clavikula platziert, die andere inguinal (Abbildung 7). Durch die Fixierung des Herzfrequenztransmitters wird verhindert, dass dieser durch Bewegungen des Tieres wandert und Zug oder Druck auf die Elektroden ausübt. Diese würden verrutschen und somit keine vergleichbaren Daten liefern. Zusätzlich besteht das Problem der Perforation der Haut, worauf beim Verlegen der Elektroden geachtet wird. Die Funktion der Sender wird überprüft und gegebenenfalls die Lage der Kontaktstellen korrigiert. Schließlich wird die Haut vernäht und die Herzfrequenzsender per Magnetschalter deaktiviert, um die Batterie zu schonen. Dieser Eingriff dauert etwa 45 Minuten. In der Folgezeit wird der Gesundheitszustand (Lokomotion, Defäkation) der Tiere besonders überprüft. Nach einer Erholungszeit von zwei bis drei Wochen kann mit den Messungen begonnen werden.

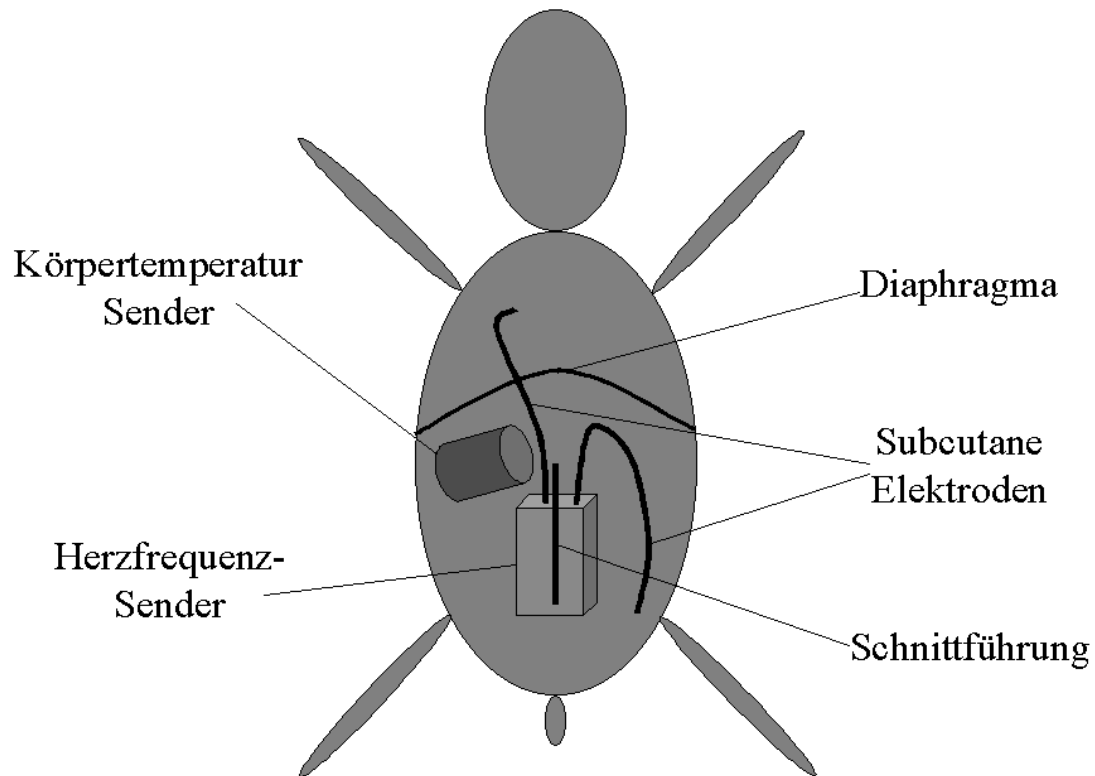


Abbildung 7: Schema der Lage der implantierten Körpertemperatur- und Herzfrequenztransmitter in einem Kleinsäuger.

Röntgenbilder zeigen die Lage der Sender in einem Zwerghamster mit verändertem EKG Signal (Abbildung 8 und Abbildung 9). Ausgelöst wurde dies durch eine Lageveränderung der Elektroden bedingt durch das Ablösen des EKG-Senders vom Bauchfell. Die Sender wurden unmittelbar darauf entfernt. Bei den anderen Phodopus wurden die Herzfrequenzsender nach sechs Monaten wieder explantiert, was diese ausnahmslos problemlos überstanden. Günstig war der Umstand, dass sich keinerlei Bindegewebe um die Sender gebildet hatte und ausschließlich die Kontaktflächen der Elektroden eingewachsen waren.



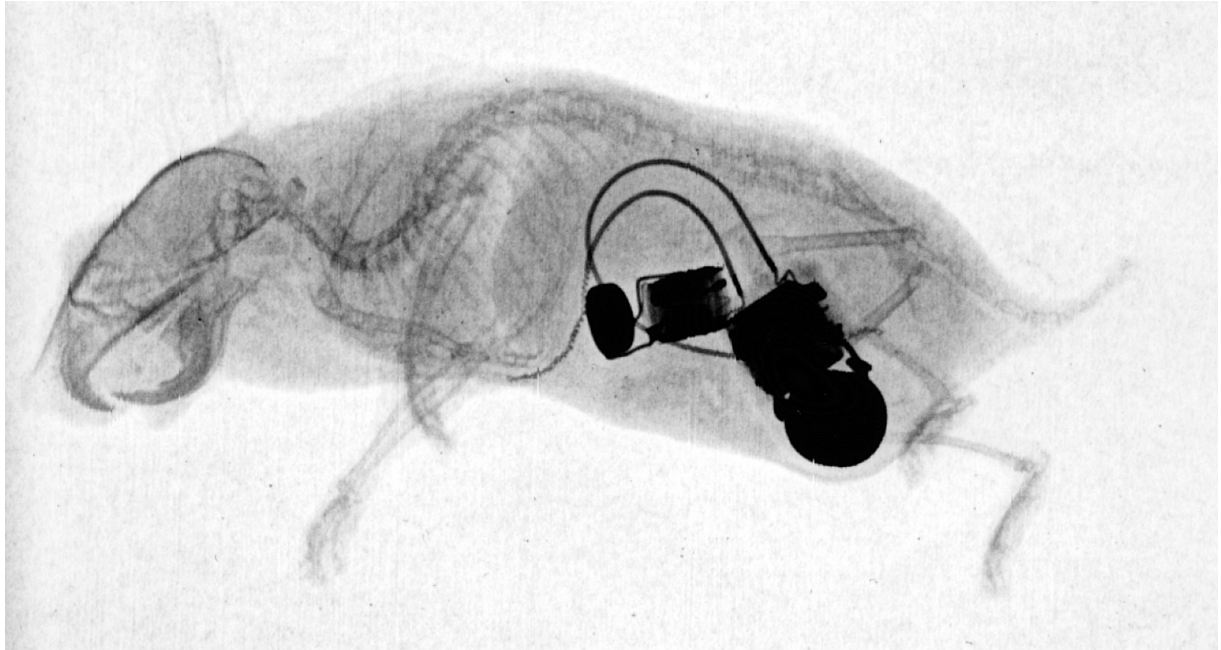


Abbildung 8: Röntgenbild (lateral) eines Zwerghamsters mit implantiertem Körpertemperatur- (links) und Herzfrequenzsender (rechts mit Elektroden).

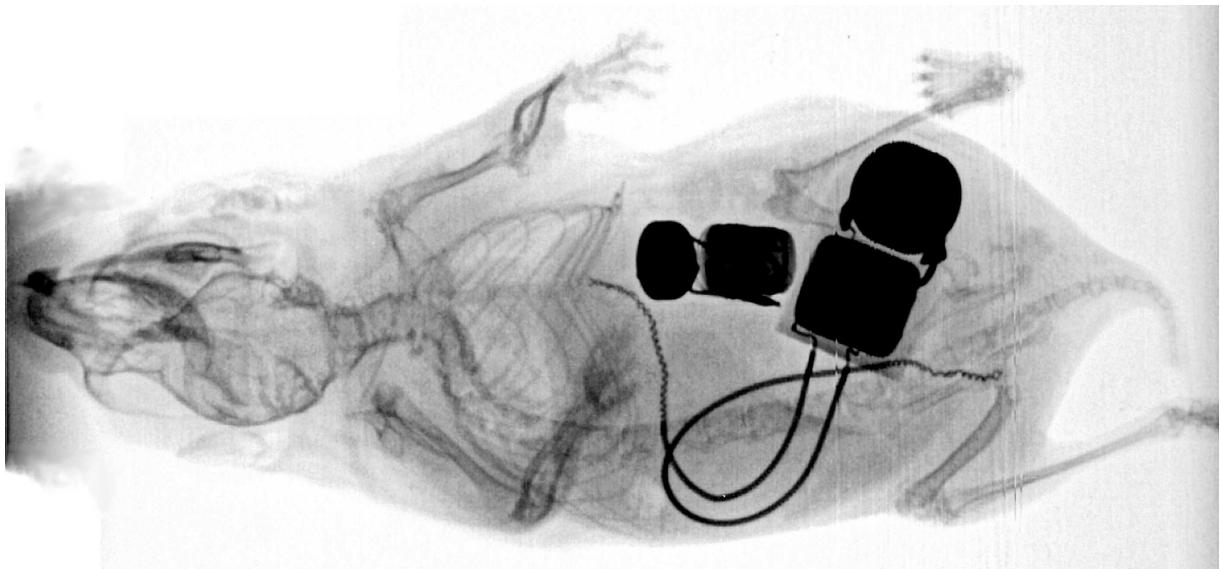


Abbildung 9: Röntgenbild (ventral) eines Zwerghamsters mit implantiertem Körpertemperatur (links)- und Herzfrequenzsender (rechts mit Elektroden).

## 2.7 Kalorimetrie

Die Metabolismusrate eines Tieres ist ein wesentlicher physiologischer Parameter und erlaubt weitreichende Aussagen und die Erklärung vieler Zusammenhänge. Bei der indirekten Kalorimetrie wird die Stoffwechselrate über die Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxidproduktion bestimmt (Abbildung 10). Einer bekannten Menge verbrauchten Sauerstoffs kann ein bestimmter Energieumsatz zugeordnet werden. Durch die Berücksichtigung der Kohlendioxidproduktion können weitergehende Rückschlüsse z. B. auf die energieliefernden Substanzen angestellt werden. Diese Methode erlaubt genaue, zeitauflösende und kontinuierliche Messungen bei minimaler Beeinflussung der Tiere.

Alternative Methoden zur Stoffwechselformung sind Isotopenmessungen mit schwerem Wasser und die direkte Kalorimetrie. Bei der Isotopenmessung wird eine bestimmte Menge schweren Wassers ( $D_2O$ ) zu einem bestimmten Zeitpunkt einem Tier gespritzt. Nach einem Zeitraum von Stunden bis wenigen Tagen wird eine Blutprobe genommen und der verbliebene Isotopengehalt darin bestimmt. Über die Verdünnung kann man auf den Stoffwechsel rückschließen. Der Vorteil der Methode ist, dass sich die Tiere im Messzeitraum vollkommen frei bewegen können und somit auch Freilandmessungen möglich sind. Die Nachteile sind eine eingeschränkte Genauigkeit, aufwendige Messungen, keine Zeitauflösung und Stress für die Tiere bei Fang, Injektion und Wiederfang. Die direkte Kalorimetrie misst die vom Tier abgegebene Wärme. Bei diesem Verfahren befindet sich das Tier in einer komplexen Messkammer. Die Methodik ist zeitauflösend und relativ genau aber aufwendig und nicht über mehrere Tage anwendbar.

Die eleganteste Methode ist jedoch die indirekte Kalorimetrie (Abbildung 10), da für die Datenaufnahme lediglich ein definierter Volumenstrom von Umgebungsluft über das Tier geleitet wird und die Methode berührungslos und nichtinvasiv ist. Die Tiere können in ihren Heimkäfigen verbleiben, die mit einer Diffusionsbarriere versehen werden. Dadurch wird erreicht, dass das Verhalten nicht durch eine neue Umgebung verändert wird. Ein schneller und einfacher Umbau der Käfige gestattet es, viele Tiere messen zu können und die Daten bereits nach kurzer Zeit, ohne Eingewöhnungsphase, verwenden zu können. Ein weiterer Vorteil ist, dass auf diese Weise Langzeitmessungen realisiert werden können. Die Messungen sind nicht auf wenige Stunden begrenzt sondern erlauben kontinuierliche Stoffwechselformungen über mehrere Tage und Wochen.

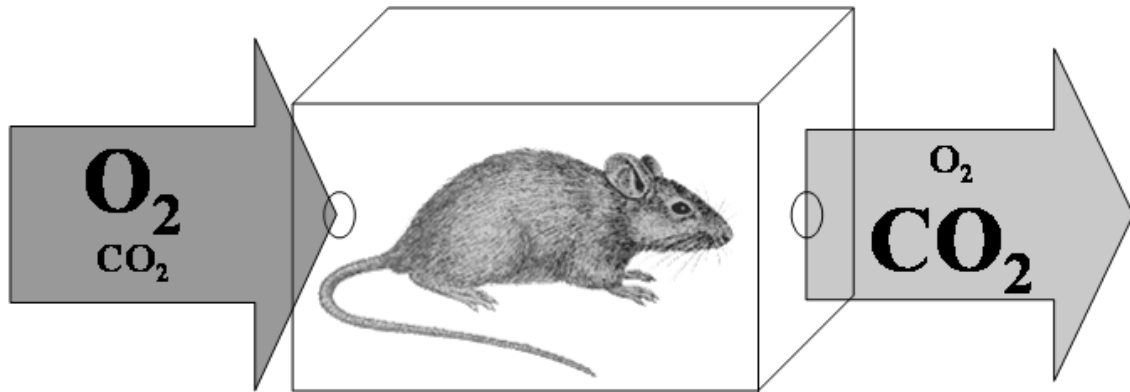


Abbildung 10: Prinzip der indirekten Kalorimetrie. Es beruht auf der Bestimmung des Differenzvolumens der Atemgase vor und nach dem Tier. Den ermittelten Differenzvolumina kann ein Energieäquivalent zugeordnet werden.

### 2.7.1 Berechnung des Energieumsatzes mittels der indirekten Kalorimetrie

Um die umgesetzte Energie berechnen zu können, müssen das durch die Küvette geleitete Volumen ( $V$ ) und die Konzentrationen von Sauerstoff ( $KO_2$ ) und Kohlendioxid ( $KCO_2$ ) vor und nach dem Tier gemessen werden.

Aus der Differenz der Konzentration der Atemgase im Gesamtvolumen vor und nach dem Tier lassen sich die Volumina des verbrauchten Sauerstoffs ( $VO_2$ ) und produzierten Kohlendioxids ( $VCO_2$ ) berechnen.

$$VO_2 = V \cdot (KO_{2\text{vor}} - KO_{2\text{nach}}) \quad \text{Gleichung 3}$$

$$VCO_2 = V \cdot (KCO_{2\text{nach}} - KCO_{2\text{vor}}) \quad \text{Gleichung 4}$$

Aus den Volumina der Atemgase wird nun der respiratorische Quotient (RQ) bestimmt:

$$\text{RQ} = \frac{V_{\text{CO}_2}}{V_{\text{O}_2}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Der RQ erlaubt Rückschlüsse auf die veratmete Stoffklasse. Dies ist für die möglichst exakte Berechnung des Metabolismus von Bedeutung, da die unterschiedlichen Stoffklassen verschiedene Energiedichten haben und bei der Reaktion mit Sauerstoff eine unterschiedliche Stöchiometrie zeigen.

Folgende Tabelle 1 zeigt einige Beispiele:

Tabelle 1: Stöchiometrie und Energieinhalt von Nahrungsgrundstoffen.

Stoff (beispielhaft)	Reaktionsgleichung	RQ	Kalorisches Äquivalent
Alanin (Protein)	$2 \text{CH}_3\text{CHNH}_2\text{COOH} + 6 \text{O}_2 \diamond$ $5 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$	$5/6 =$ <b>0,83</b>	19,4 kJ / lO <sub>2</sub>
Palmitin- säure (Fett)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH} + 23 \text{O}_2 \diamond$ $16 \text{CO}_2 + 16 \text{H}_2\text{O}$	$16/23 =$ <b>0,7</b>	19,48 kJ / lO <sub>2</sub>
Glucose (Kohlen- hydrat)	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2 \diamond$ $6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$	$6/6 =$ <b>1,0</b>	21,0 kJ / lO <sub>2</sub>

Die Berechnung des Energieumsatzes kann demnach vereinfacht und näherungsweise mit Gleichung 5 geschehen:

$$\text{Faustregel: } 1 \text{ l O}_2 = 20 \text{ kJ} \quad \text{Gleichung 6}$$

Mit Kenntnis des respiratorischen Quotienten lässt sich die Stoffwechselrate genauer bestimmen.

Ein generelles Problem bei der Berechnung stellt die Veratmung von Proteinen dar, die sich nur schwer berücksichtigen lassen. Zum einen wird der Stickstoff über Harnstoff ausgeschieden, der ja wiederum Kohlendioxid gebunden hat und dadurch die Messwerte verfälscht. Für eine exakte Messung müsste die Harnstoffmenge im Urin mit berücksichtigt werden. Zum anderen erlaubt der RQ nur die Bestimmung des Verhältnisses zweier

Komponenten. Da in vielen Fällen Kohlenhydrate und Fette den weitaus größten Anteil an den Energie liefernden Stoffen haben, wird der Anteil der Proteine entweder vernachlässigt oder als Konstante festgelegt. Bei Nagern liegt der Proteinanteil im allgemeinen unter 15 % (Kleiber, 1967). Das Standardfutter der Mäuse (Mäuse/Ratten Standard Haltungsfutter, Altromin) enthält 19 % Rohprotein.

Eine pragmatische und relativ genaue Berechnungsmöglichkeit bietet sich bei Betrachtung von Tabelle 2 an. Die Energieeinheit Kalorie ist bewusst gewählt, um zu zeigen, dass vier plus dem respiratorischen Quotienten die Sauerstoffmenge [ml] ergibt, dem das kalorischen Äquivalent [cal] entspricht.

Tabelle 2: Kalorisches Äquivalent und RQ von Fetten und Kohlenhydraten.

Stoff	kalorisches Äquivalent (genähert)	RQ
Fette	4,7 cal/mlO <sub>2</sub>	0,7
Kohlenhydrate	5,0 cal/mlO <sub>2</sub>	1,0

Hieraus ergibt sich:

$$\text{Energieumsatz[cal]} = (4,0 + \text{RQ}) \cdot \text{VO}_2[\text{ml}] \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Umrechnung von Kalorien (cal) in Joule(J) erfolgt über den Faktor 4,187:

$$1 \text{ cal} = 4,187 \text{ J} \quad \text{Gleichung 8}$$

Zusammengefasst:

$$\text{Energieumsatz[kJ]} = (4,0 + \text{RQ}) \cdot 4,187 \cdot \text{VO}_2[\text{l}] \quad \text{Gleichung 9}$$

Eine weitere Berechnungsmöglichkeit, unter Berücksichtigung aller Energie liefernden Stoffe bietet Heldmaier (1975). Anhand von Tabellen mit kalorischem Äquivalent und dem entsprechenden Sauerstoffverbrauch entwickelte er folgende Formel:

$$\text{HP[W/g]} = (4,44 + 1,43 \cdot \text{RQ}) \cdot \text{M}[\text{l/g}^{-1}\text{h}^{-1}] \quad \text{Gleichung 10}$$

HP auf der linken Seite steht hier für die Wärmeproduktion bzw. Leistung des Tieres [W]. Auf der rechten Seite ist der entsprechende Sauerstoffverbrauch [l/h] angegeben. Um Gleichung 9 an die oben gezeigten Verhältnisse ( $x \cdot [\text{kJ}] = y \cdot [\text{l}]$ ) anzupassen, müssen die Zeiteinheiten auf beiden Seiten vereinheitlicht werden.

Unter Berücksichtigung, dass Joule als Watt mal Sekunde definiert ist ( $J := W \cdot s$ ), gilt folgende Zahlenwertgleichung.

$$\text{Energieumsatz}[\text{kJ}] = (4,44 + 1,43 \cdot RQ) \cdot 3,6 \cdot \text{VO}_2[\text{l}] \quad \text{Gleichung 11}$$

## 2.7.2 Aufbau des indirekten Kalorimeters

Es lassen sich zwei Baumuster für indirekte Kalorimeter unterscheiden. Im geschlossenen System zirkuliert die Luft zwischen Versuchstier und den Messeinrichtungen. Es gibt keinen Luftaustausch mit der Umgebung. Fixiert man nun Kohlendioxid mit Atemkalk ( $\text{CO}_2 + \text{Ca}(\text{OH})_2 \leftrightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ ) so erscheint dessen Volumen nicht mehr als Ausgleich für veratmeten Sauerstoff. Zu beachten ist die Trocknung der Luft vor der Kalkpatrone. Durch Auswiegen der Kalkpatrone und Bestimmen des Fehlvolumens im geschlossenen System können die Atemgase gemessen werden. Diese Methode erfordert keinen hohen apparativen Aufwand, ist aber nicht zeitauflösend und für Dauermessungen ungeeignet.

Das offene System arbeitet in der beschriebenen Weise Umgebungsluft über das Tier zu leiten. Bestimmt werden hierbei die Konzentrationsänderungen der Atemgase und das Volumen der über das Tier geleiteten Luft. Das entwickelte Kalorimeter arbeitet als offenes System. Ein solches Kalorimeter benötigt bestimmte Bauteile: Herzstück ist ein Analysator zur Messung der Atemgaskonzentrationen und ein Flussmesser, der die Luftmenge bestimmt. Damit ein kontrollierbarer Volumenstrom zustande kommt, ist eine Pumpe und eine Messkammer notwendig. Schließlich muss das Messgas vor der Analyse noch getrocknet werden. Mit diesen Komponenten ist bereits ein indirektes Kalorimeter realisierbar. Es lassen sich damit aber keine Vergleichsmessungen anstellen, und es ist nur ein Tier messbar. Damit mehrere Messkanäle möglich werden, sind zusätzliche Pumpen, Ventile und Trockner erforderlich. Um Dauermessungen umsetzen zu können, ist der Aufbau noch mit einer automatisierten Steuerung und Datenaufnahme auszurüsten. Der folgende Abschnitt behandelt den Aufbau des entwickelten indirekten Kalorimeters. Der Einsatzzweck ist die Langzeitmessung des Stoffwechsels von Kleinsäugetieren unter verschiedenen Bedingungen.

Gleichzeitig sollte die Option offen bleiben, die Anlage mit möglichst geringem Aufwand an verschiedene Tiergrößen und damit Stoffwechselraten anpassen zu können. Sie soll die Möglichkeit bieten, viele Tiere parallel zu messen und dabei robust, kompakt und mobil sein, um sie in den Tierhaltungsräumen betreiben zu können.

Realisiert wurde ein Aufbau, mit dem fünf Tiere sowie die Umgebungsluft iterativ gemessen werden können und der auf einem rollbaren Gestell (L x B x H: 80 x 70 x 150 cm) montiert ist. Für jedes Tier sind separate Pumpen, Flussmesser- und Anzeiger, Ventile und Trockner vorgesehen, wodurch die Wiederholrate der Messungen erhöht werden kann. Eine Zusatzpumpe fördert die Umgebungsluft, die als Referenz benötigt wird. Über einen zentralen Flussmesser und Gasanalysator werden alternierend die Werte der einzelnen Messkanäle ermittelt. Ein PC mit eigens entwickelter Software steuert die Anlage und speichert die Daten (Abbildung 11). Ähnliche Aufbauten existieren bereits an Instituten in Marburg oder Bielefeld, diese sind aber fest an einen Standort gebunden. Durch die Mobilität der hier beschriebenen Anlage sind Messungen der Tiere in deren vertrauter Umgebung möglich. Auf einen Transport der Tiere kann verzichtet werden, wodurch die Messungen bereits von Beginn an Aussagekraft haben können und keine Eingewöhnungsphase nötig wird. Langzeitmessungen über mehrere Wochen sind damit möglich.

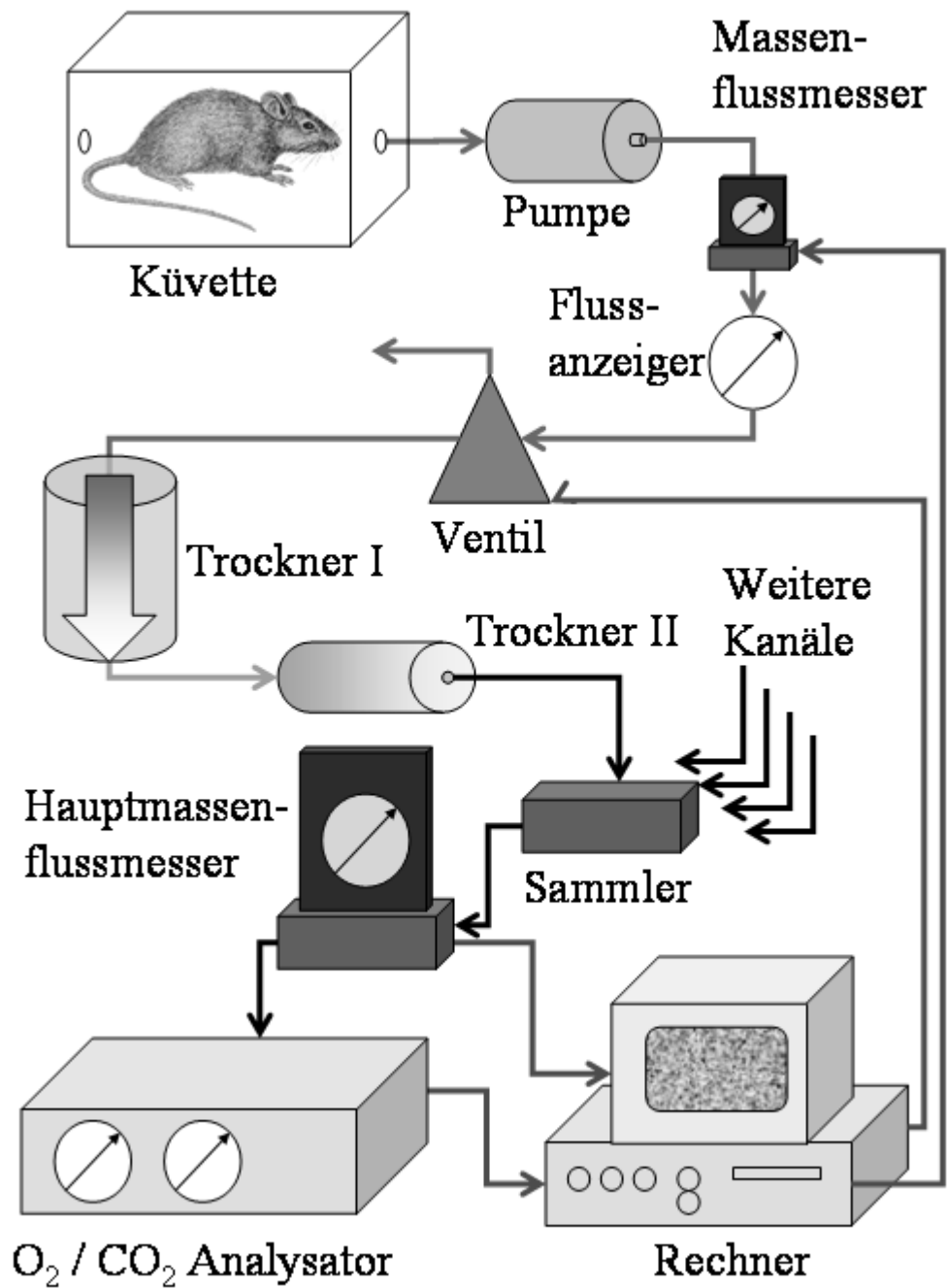


Abbildung 11: Schema des Aufbaus der Anlage zur Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxidproduktion von fünf Tieren. Die Umgebungsluft wird über eine separate Leitung dem Sammler zugeführt (nicht dargestellt).



### 2.7.2.1 Küvetten

Die Messkammern müssen verschiedene Bedingungen erfüllen. Zum einen sollen die Tiere nicht durch die Messung beeinflusst werden, d.h. die Bedingungen während der Kalorimetrie sollen sich möglichst wenig von den normalen Haltungsbedingungen unterscheiden. Zum anderen soll ein Umbau der Haltungskäfige zur Messkammer schnell und unkompliziert vonstatten gehen und die Küvetten diffusionsdicht sein. Weiterhin müssen die Tiere ohne eine Unterbrechung der Messungen versorgt werden können, und schließlich muss ein kontinuierlicher Luftfluss gewährleistet sein. Der Aufbau der Küvetten wurde möglichst einfach gestaltet, indem anstelle des Deckels eine Acrylglasplatte von 4 mm Stärke mit Gummis auf dem Heimkäfig (siehe 2.2 Haltungsbedingungen) der Tiere befestigt wird (Abbildung 12). Somit ergibt sich ein Messraum von 5 l Volumen. Durch die Transparenz des Materials werden die Beleuchtungsverhältnisse nicht verändert. In der Platte befindet sich im hinteren Drittel eine Bohrung von 8 mm und zentral eine Ausfräsung von 30 mm x 40 mm. Die Bohrung ermöglicht den Lufteintritt in die Küvette und nimmt eine Trinkflasche auf, wodurch auf eine Flüssigkeitsversorgung mit Apfelstücken, die bei längeren Messungen hygienische Probleme bereitet, verzichtet werden kann. Auch wird die Feuchtigkeit in der Messkammer dadurch deutlich reduziert, was die Verwendung von zusätzlicher Einstreu (z.B. Katzenstreu) zur Feuchtigkeitsregulierung unnötig macht. Die Ausfräsung nimmt den Bewegungsmelder auf. Dieser wird diffusionsdicht durch zwei Acrylglasbacken eingeklemmt und ist somit in der gleichen Position wie auf den Drahtdeckeln. Der Bewegungsmelder kann leicht entfernt werden und gibt dann die Ausfräsung frei, durch die z.B. Futter gegeben werden kann. Ein komplettes Öffnen und die damit verbundene Messunterbrechung und Störung des Tieres entfällt somit. Durch die Aussparung an der Stirnseite des Käfigs wird ein Schlauchnippel (Messing, 1/4“ Gewinde) mit Dichtplatte gesteckt und über eine Mutter (Messing) von innen gekontert. Auf diesen Anschluss wird ein Siliconschlauch (Länge: 100 mm, InnenØ: 4 mm, Wandstärke: 0,8 mm) gesteckt, der auf dem Konus einer 20 ml Spritze endet. Der Konus hat eine lockerere Verbindung zu dem Siliconschlauch als der Anschlussnippel und dient als „Sollbruchstelle“, um zu verhindern, dass der Käfig heruntergerissen werden wird, falls an dem Schlauch gezogen werden sollte. In der Spritze befindet sich als Staubfilter 1 cm Schaumstoff. Der Innenraum der Spritze wird durch den Stempel abgedichtet, der in einer Bohrung einen PVC Schlauch (InnenØ: 4 mm, Wandstärke: 0,8 mm) aufnimmt. Über diesen Schlauch sind die Küvetten mit Pumpen verbunden, die die

Luft ansaugen. Somit ergibt sich ein Volumenstrom durch die Bohrung der Wasserflasche in die Küvette und durch den Schlauchanschluss wieder heraus.

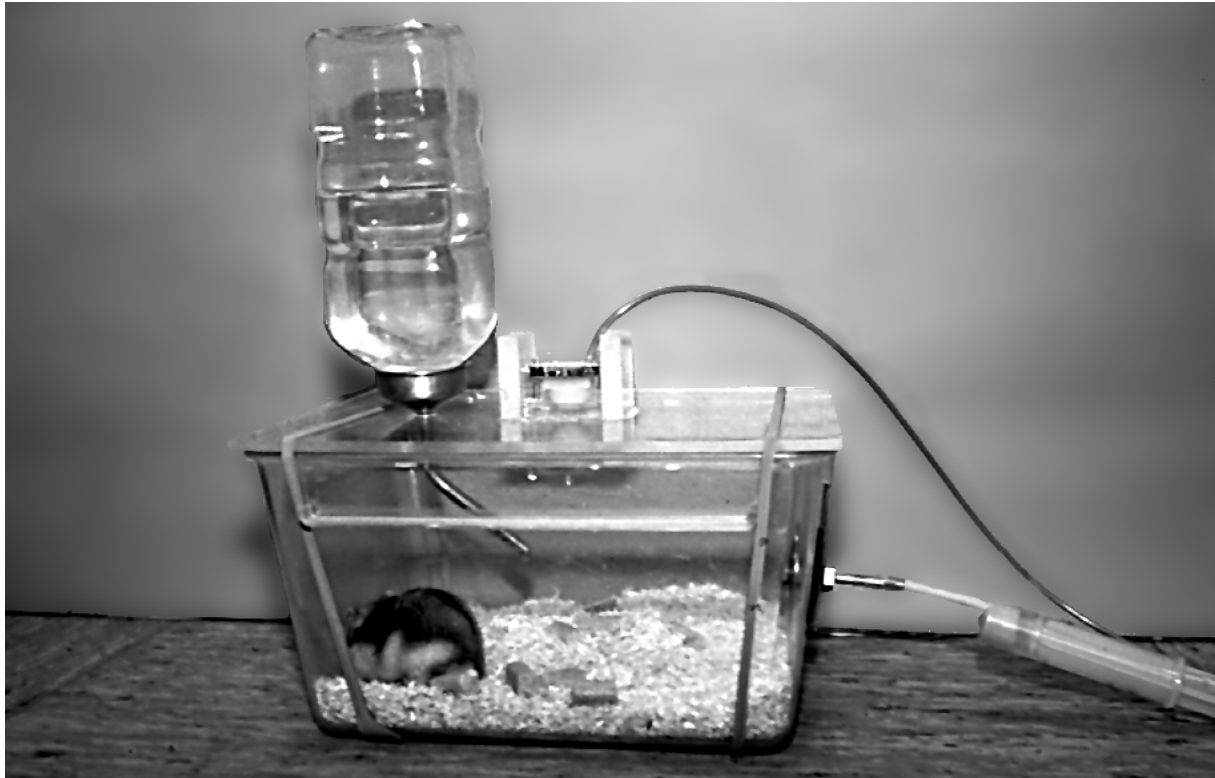


Abbildung 12: Der Heimkäfig wird mit einer Acrylglasplatte verschlossen und dient als Messküvette. Die Platte nimmt über eine 8 mm Bohrung die Trinkflasche auf. Ein Bewegungsmelder ist diffusionsdicht über einer Ausfräsung von 30 x 40 mm zentral angebracht. Über diese Öffnung kann auch gefüttert werden.

### 2.7.2.2 Pumpen

Die Pumpen sollen gasdicht, geräuscharm, gleichmäßig und zuverlässig über lange Zeit arbeiten. In der Anlage kommen fünf Schwingankerpumpen (TRS 70 0010, 230 VAC, Schego) zum Einsatz. Sie werden mit Netzstrom betrieben und können maximal 150 l/h Pumpleistung erbringen. Geregelt werden sie über Potentiometer und Schalter an der Stirnseite. In der Praxis liegt meist 30 l/h Pumpleistung an. Die Pumpen sind gut zugänglich montiert und verfügen über Anschlussnippel für die Ein- und Ausgänge, auf die Schläuche gesteckt werden. Ab den Ausgängen der Pumpen werden in dem, nun unter Druck stehenden System, die besonders gasdichten Tygon Schläuche (R3603 InnenØ: 4 mm, Wandstärke: 0,8 mm, Novodirekt) verwendet. Als Referenz (2.7.2.5 Ventile) wird Umgebungsluft mittels einer besonders platzsparenden Membranpumpe (NF30KNDC, 6 VDC, 90 l/h, KNF Neuberger) angesogen. Eine Relaiskarte (Centronics Interface acht Kanal, Conrad Elec.)

ermöglicht es, diese Pumpe anzusteuern. Die Stromversorgung erfolgt über den Rechner, wodurch ein zusätzliches Netzteil eingespart wird.

### *2.7.2.3 Massenflussmesser*

Hinter den Pumpen sind in jedem Kanal Massenflussmesser (Honeywell AWM 3300V, Farnell) angeordnet. Diese erlauben die kontinuierliche Registrierung einer Luftmenge von 0 bis 60 l/h. Ihr Spannungssignal von 1 bis 5 V wird über einen Analog-Digital Wandler (CIO-DAS08, acht Kanal 12 bit 20 kHz, Plug-in) mit Multiplexer (CIO-EXP32/16, erweitert auf 32 Kanäle, Plug-in) ausgelesen. Die Stromversorgung (10 VDC) erfolgt wiederum über den PC und einen Spannungskonstanthalter (IC Type 78S10, Conrad Elec.). Im Kapitel 2.7.2.7 Hauptmassenflussmesser ist die Flussregistrierung und Berechnung detailliert dargelegt.

### *2.7.2.4 Flussanzeiger*

Zur optischen Kontrolle der Flüsse aller Kanäle sind auf der Stirnseite des Aufbaus Flussanzeiger (Schwebkörper-Kleindurchflussmesser Brooks-Mite PT 2700 316SS Schwimmer, Brooks) mit einem Anzeigebereich von 0 bis 80 l/h installiert. Sie erleichtern die Regelung der Pumpenleistung und geben einen realen Überblick über die Flussrate in allen Küvetten. Sollte einmal eine Störung vorliegen, kann diese so schnell erkannt werden.

### *2.7.2.5 Ventile*

Der Aufbau verfügt über fünf Messkanäle, aber nur einen Analysator. Daher werden die Tiere nacheinander in sich wiederholenden Zyklen gemessen. Eine bestimmte Zeit, in diesem Fall jeweils eine Minute, wird die Luft aus einer Küvette analysiert. Währenddessen müssen die Pumpen der anderen Kanäle weiterlaufen, um eine kontinuierliche Ventilation in der Küvette sicherzustellen. Über bistabile Magnetventile (3/2 Wege Magnetventil Typ 0330, 12 VDC, Bürkert) kann der Luftfluss jedes Kanals in die Messapparatur geleitet werden oder in die Umgebung abgelassen werden. Der Vergleichsluftkanal kommt ohne Ventil aus, hier wird über die Relaiskarte die Pumpe angeschaltet, wenn Vergleichsluft gefördert werden soll (2.7.2.2 Pumpen). Die Stromversorgung der mit einer Magnetspule arbeitenden Ventile erfolgt über ein separates Netzteil. Diese galvanische Trennung von den anderen Komponenten ist notwendig, da die Stromaufnahme der Ventile beim Schalten kurzfristig mehrere Ampere

beträgt und die Spulen Spannungsspitzen erzeugen, die die elektronischen Bauteile gefährdet. Über die oben erwähnte Relaiskarte (Centronics Interface acht Kanal, Conrad Elec.) werden auch die Ventile vom PC aus angesprochen. Die Versorgung der Relaiskarte geschieht zur galvanischen Trennung ebenfalls über ein separates Netzteil. So ist eine automatische Vorwahl der zu messenden Tiere und der Vergleichsluftmessung per PC möglich.

### *2.7.2.6 Trocknung des Messgases*

Soll ein Kanal gemessen werden, wird zuerst die Luft getrocknet. Bei der eingesetzten Infrarot-Messmethode für Kohlendioxid entsteht durch Wasserdampf eine Querempfindlichkeit. Außerdem würde sie die exakte Volumenmessung stören und den Komponenten schaden. Luftfeuchtigkeit ist mit dieser Ausrüstung nicht messbar und auch nicht berechenbar. Ziel ist es, die Luftfeuchtigkeit auf einem konstant niedrigen Niveau zu halten, um die Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Für kurze Messintervalle und somit eine schnelle Wiederholfolge der zu messenden Kanäle, ist die Reduzierung des Totraums vor der Analyse entscheidend. Je weniger Luft des zuvor gemessenen Kanals nach dem Umschalten noch durch die Analyse gepumpt werden muss, desto schneller wird das Gas des aktuellen Kanals gemessen. Da die Trocknung viel Volumen beansprucht, wird jeder Kanal separat getrocknet. Erst dann wird das Messgas der zentralen Analyse zugeführt.

Die Lufttrocknung kann auf physikalischem oder chemischem Weg geschehen. Die physikalische Trocknung beruht auf einer Temperaturverringerung des Messgases. Dies bedingt eine Absenkung des Taupunkts und eine geringere Löslichkeit des Wassers in Luft, der Großteil der gelösten Feuchtigkeit kondensiert aus. Diese Methode führt zu einer gleichmäßigen Trocknung über lange Zeit, wenn die Temperatur und der Luftfluss konstant gehalten werden. Allerdings verbleibt ein Rest Feuchtigkeit in der Luft. In dem Kondenswasser löst sich zudem ein gewisser Teil der zu messenden Atemgase, was durch die niedrigen Temperaturen noch begünstigt wird. Zusätzlich reagiert gelöstes Kohlendioxid mit Wasser zu Kohlensäure, was den Effekt verstärkt. Bei der chemischen Trocknung bindet eine hydrophile Substanz das Wasser. Verwendet wird zumeist Silica Gel, eine körnige Substanz aus  $\text{SiO}_2$  und einem Feuchtigkeitsindikator. Es kann bis zu 20 % seines Gewichts an Wasser aufnehmen und verändert dabei seine Farbe von blau nach rot. Bei Temperaturen von 120 bis 170 °C kann es regeneriert werden. Bei dieser Art Trocknung wird das Wasser weitgehend aus der Luft entfernt. Auch stellt sich nicht das Problem der gelösten Gase im Kondenswasser, da die Feuchtigkeit gebunden ist. Allerdings ist die Trocknung nicht konstant, da sich das

Silica verbraucht. Erhöht man die Menge des Trocknungsmittels, werden die Wartungsintervalle zwar länger und die Messung konstanter, aber die Verschleppung der Gase erhöht sich, was die Zeitauflösung deutlich verringert.

Im beschriebenen Aufbau kommen beide genannten Verfahren zur Anwendung. Im ersten Schritt wird die Messluft in einem eigens modifizierten Gaskühler getrocknet. Der Kühler (Elektro-Gaskühler ECP1000-G, 50 ml Volumen, M&C Products) hat eine Leistungsaufnahme von 100 W und ist für einen Volumenstrom von maximal 150 l/h ausgelegt. Ein Peltierelement kühlt einen Aluminiumblock mit einer senkrechten 25 mm Bohrung von 120 mm Tiefe. Eine Regelelektronik ermöglicht die Temperatur konstant ( $\pm 0,5$  °C) einzustellen. Es wurde 1 °C gewählt, um ein Einfrieren zu verhindern. Der Originalaufbau nimmt in der Bohrung einen Wärmetauscher aus Duranglas auf, der in einem Labyrinthsystem die Luft abkühlt. Das Kondenswasser sammelt sich in einem Schlauch. Dieses System ist gut geeignet, um einen großen Luftstrom zu kühlen, nicht aber fünf kleine, separate Luftkanäle. Aus diesem Grund haben wir in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen einen eigenen Wärmetauscher entwickelt (Abbildung 13). Dieser besteht aus gut wärmeleitendem Aluminium und passt in die vorhandene Bohrung. Um die fünf Messkanäle aufzunehmen, wird der Aluminiumkern konzentrisch mit je zwei 3 mm Bohrungen pro Kanal versehen. Hierdurch wird eine Vergrößerung der Kondensationsfläche erreicht und die Luftströmung verlangsamt, um eine vollständigere Trocknung zu erzielen. Zusätzlich befinden sich in den Bohrungen feine gewellte Drähte, die die Feuchtigkeit auskämmen. Der Luftstrom wird von oben nach unten parallel durch die Bohrungen geleitet. Damit wird ein hoher Temperaturgradient erreicht und sichergestellt, dass das Kondensationswasser mit dem Luftstrom aus den Bohrungen getrieben wird. Edelstahlröhren dienen als Anschlussnippel für die Luftschläuche. Dieser Kern wird in die Bohrung des Gaskühlers gegeben und mit Wärmeleitpaste thermisch angeschlossen. Um die Kühlleistung des Gastrockners effektiv zu nutzen, wird jeweils nur die Luft des zu messenden Kanal getrocknet. Unter dem Zylinder werden die Bohrungen eines Kanals wieder in einer Spritze (Plastipak, 20 ml) zusammengefasst, die auch das Kondenswasser aufnimmt. Durch Herausnehmen des Stempels kann man es ablassen. Dieser Aufbau ermöglicht auch einen raschen Umbau zur Messung nur eines Kanals mit hohem Fluss unter Verwendung des Duranglaswärmetauschers.

Zur weiteren Trocknung kann Silica Gel (Blaugel 1-3 mm, Roth) eingesetzt werden. Es wird in Spritzen (Plastipak, 20 ml) gegeben, die mit einem gelochten Gummistopfen verschlossen

sind. Diese Trocknungspatronen werden in den Volumenstrom hinter dem Kondensationstrockner gegeben und halten etwa 24 h vor. In der Praxis hat sich bei Langzeitmessungen aber die ausschließliche Kondensationstrocknung als pragmatischer erwiesen, da die Ergebnisse hierbei weniger schwanken.

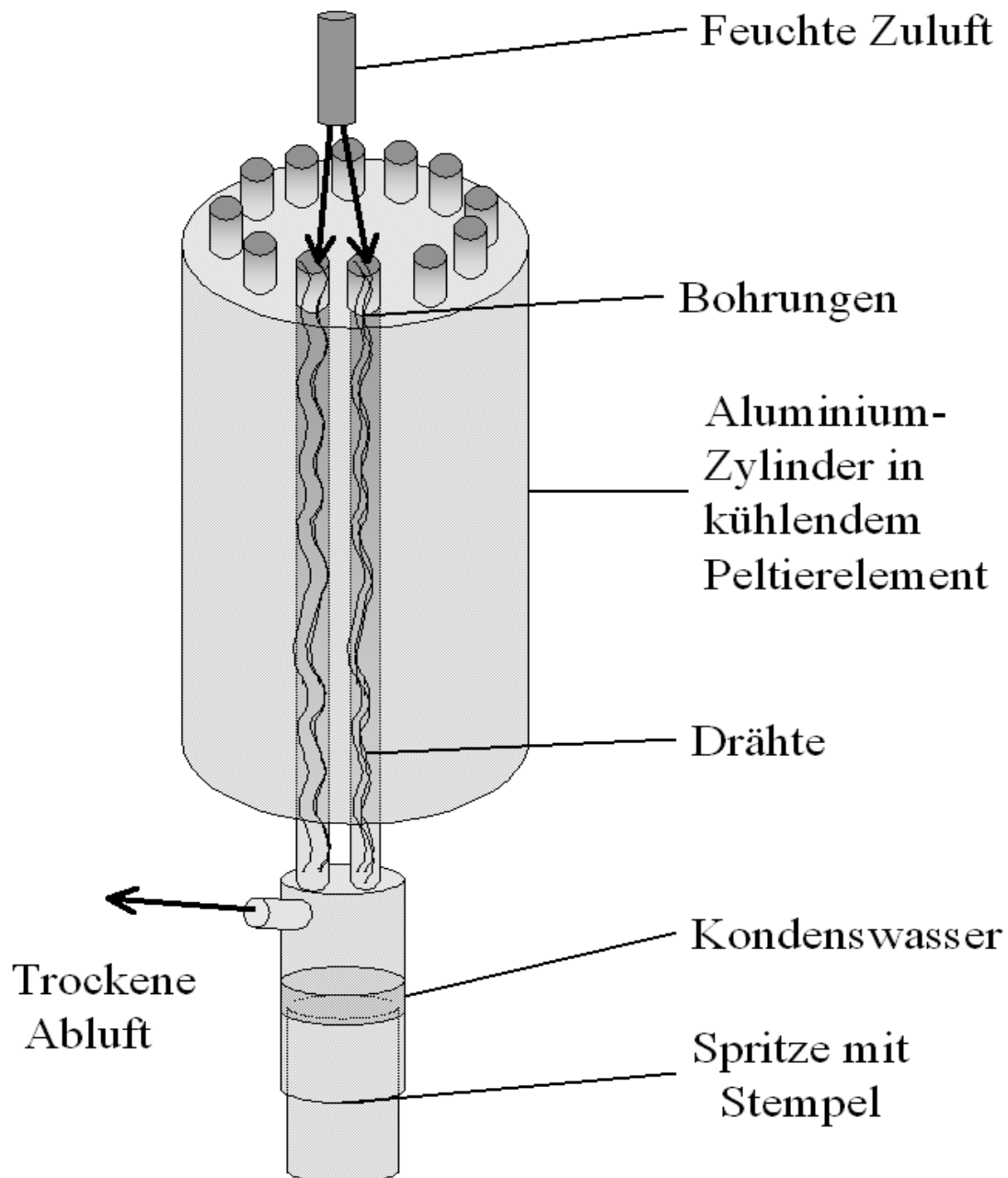


Abbildung 13: Schema des entwickelten Wärmetauschers für fünf Messkanäle. Die zu messende Luft wird von oben in jeweils zwei Leitungen pro Messkanal geleitet, wo der Taupunkt erniedrigt wird und die Luftfeuchtigkeit auskondensiert. Durch die Verwendung von zwei Bohrungen wird die Kondensationsfläche vergrößert und die Luftströmung verlangsamt. An den Drähten kondensiert zusätzlich Feuchtigkeit. Ein Behälter fängt das Kondenswasser auf.

### 2.7.2.7 Hauptmassenflussmesser

Nach der Trocknung, die ja noch für jeden Kanal separat geschieht, werden in einem Aluminiumblock die fünf Messkanäle und der Vergleichskanal zusammengeführt und an den Hauptmassenflussmesser weitergeleitet. Über die rechnergesteuerte Relaiskarte und die Ventile wird sichergestellt, dass immer nur ein Kanal der Messung zugeführt wird. Der Hauptmassenflussmesser gibt über einen Gleichspannungsausgang ein linearisiertes Signal zwischen 0 und 5 Volt aus. Die Volumenmessung ist im Folgenden detailliert beschrieben.

### 2.7.2.8 Volumenmessung

Die Volumenmessung geschieht über Massenflussmesser. In diesen wird die zu messende Luft in einem laminaren Fluss über eine konstant ausgeheizte Oberfläche geleitet. Die von der Luft aufgenommene Energie ist proportional der Luftmenge. Gemessen wird der Temperaturunterschied vor und nach einem Heizelement im Luftfluss. Da es sich bei diesem Messverfahren letztenendes um eine Molekülzählung handelt, ist es temperatur- und druckunabhängig. Über die Wärmekapazität  $C_p$  [J/mol] des Gases kann sein Volumen berechnet werden (unter Standardbedingungen:  $1 \text{ mol} = 22,4 \text{ l}$ ).

Zum Einsatz kommen als Hauptmassenflussmesser ein MKS Type 358C (MKS Instruments GmbH, München) und fünf Massenflussmesser Honeywell AWM3300V (Micro Switch, Honeywell Inc. Freeport, Illinois, USA). Beide Typen arbeiten nach dem oben beschriebenen Prinzip. Der MKS gibt ein linearisiertes Signal ab, er verfügt wie die Honeywell Geräte über einen Spannungsausgang. Das Signal der Honeywell Instrumente wurde in Abhängigkeit vom Luftfluss gemessen und wird im selbstentwickelten Datenakquisitionsprogramm über eine Regression linearisiert.

Der Messbereich beträgt jeweils 60 l/h, unter Messbedingungen wird zumeist mit einem Volumenstrom von 30 l/h gearbeitet.

### 2.7.2.9 Korrektur des Massenflussmessers

Die Massenflussmesser sind ab Werk mit 100 Vol% Stickstoff kalibriert worden. Auch beziehen sich die meisten Flussmesser auf reinen Stickstoff. Betrieben werden sie aber mit Luft. Diese besteht lediglich zu 78 Vol% aus  $\text{N}_2$ . Die Korrektur geschieht unter Berücksichtigung der Daten aus Tabelle 3:

Tabelle 3: Vergleich der Dichte und Wärmekapazität von Luft und N<sub>2</sub>

<b>Gas</b>	<b>Spezifische Wärme- Kapazität [J/g°C]</b>	<b>Dichte [g/l] (0°C)</b>	<b>Wärmekapazität pro Volumen [J/l] (0°C)</b>
N <sub>2</sub>	1,0405	1,250	0,8323
Luft	1,0048	1,293	0,7771

Die Differenz der Wärmekapazität beträgt 0,0552 J/l was 6,63 % des Wertes für Stickstoff darstellt. Daraus ergibt sich der Korrekturfaktor für Luft ( $k_L$ ):

$$k_L = 1,0663$$

Gleichung 12

Streng genommen müsste man auch die wechselnde Zusammensetzung der Luft nach der Veratmung berücksichtigen. Ein Unterschied in der spezifischen Wärmekapazität ( $C_p$ ) von CO<sub>2</sub> ( $C_p = 0,8441 \text{ J/g°C}$ ) und O<sub>2</sub> ( $C_p = 0,9182 \text{ J/g°C}$ ) ist vorhanden. Die Unterschiede in den Volumenanteilen der Atemgase vor und nach der Küvette sind aber im Verhältnis zum Gesamtvolumen gering und der Berechnungsaufwand hoch. Eine solche Korrektur würde die Genauigkeit nicht weiter erhöhen. Geht man von einem, bereits hoch gewählten, Konzentrationsunterschied von 1 Vol% aus und legt die genannten Wärmekapazitäten für Luft, Sauerstoff und Kohlendioxid zugrunde so ergibt sich für die mit Kohlendioxid angereicherte Luft eine spezifische Wärmekapazität von  $C_p = 1,0032 \text{ J/g°C}$ . Der Unterschied zur Umgebungsluft beträgt somit 0,16% und ist im Verhältnis zu anderen Fehlern vernachlässigbar.

### 2.7.2.10 *Kalibrieren der Massenflussmesser*

Die Massenflussmesser sind ab Werk kalibriert. Um aber auch nach längerem Gebrauch genau messen zu können und zur Verifizierung der Angaben ist eine Methode zur Kalibrierung entwickelt worden. Hierbei sollte mit vorhandenen Mitteln eine reproduzierbare Messung erreicht werden. Gelöst wurde diese Fragestellung durch ein einfaches und ungiftiges System zur Verdrängung eines Luftvolumens durch eine messbare Menge Flüssigkeit.

Ein offener Behälter mit Wasser wird erhöht postiert und über einen Schlauch mit einem geschlossenen Behälter verbunden. Das Wasser läuft in den geschlossenen Behälter und verdrängt dort sein Volumen an Luft, die durch den Massenflussmesser geleitet wird. Über



eine Waage (EW 6000-1M, Kern) wird die Rate des zulaufenden Wassers im unteren Behälter bestimmt. Sowohl das Signal des Massenflussmessers als auch der Waage werden mit einem PC aufgenommen (Abbildung 14).

Das Wasser hat bei 23 °C die Dichte ( $\rho = 1 \text{ g/ml}$ ), wodurch die Umrechnung des Wassergewichts in Volumen einfach ist, da die Waage bereits die Umrechnung der Gewichtskraft in die Masse des Wassers übernimmt. Somit kann bei Zimmertemperatur die Rate des Wasserzulaufes ( $F_W [\text{g/s}]$ ) direkt in den Luftfluss ( $F_L [\text{ml/s}]$ ) umgerechnet werden. Durch den sich verändernden hydrostatischen Druck im oberen Behälter erhält man eine langsam abfallende Flussrate und kann somit einen weiten Teil des Messbereichs der Flussmesser abdecken (Abbildung 15). Sollten die Werte nicht übereinstimmen, so wird über eine Regressionskurve die Abweichung des Flussmessers von der Waage bestimmt und im Datenakquisitionsprogramm berücksichtigt.

Die Methodik ist zweifellos sehr einfach allerdings mit einigen Ungenauigkeiten behaftet. Sie ist aber dazu geeignet, Abweichungen aufzudecken. Im Folgenden ist die Methode anhand einer Zeichnung erklärt (Abbildung 14) sowie eine Beispielmessung (Abbildung 15) abgebildet.

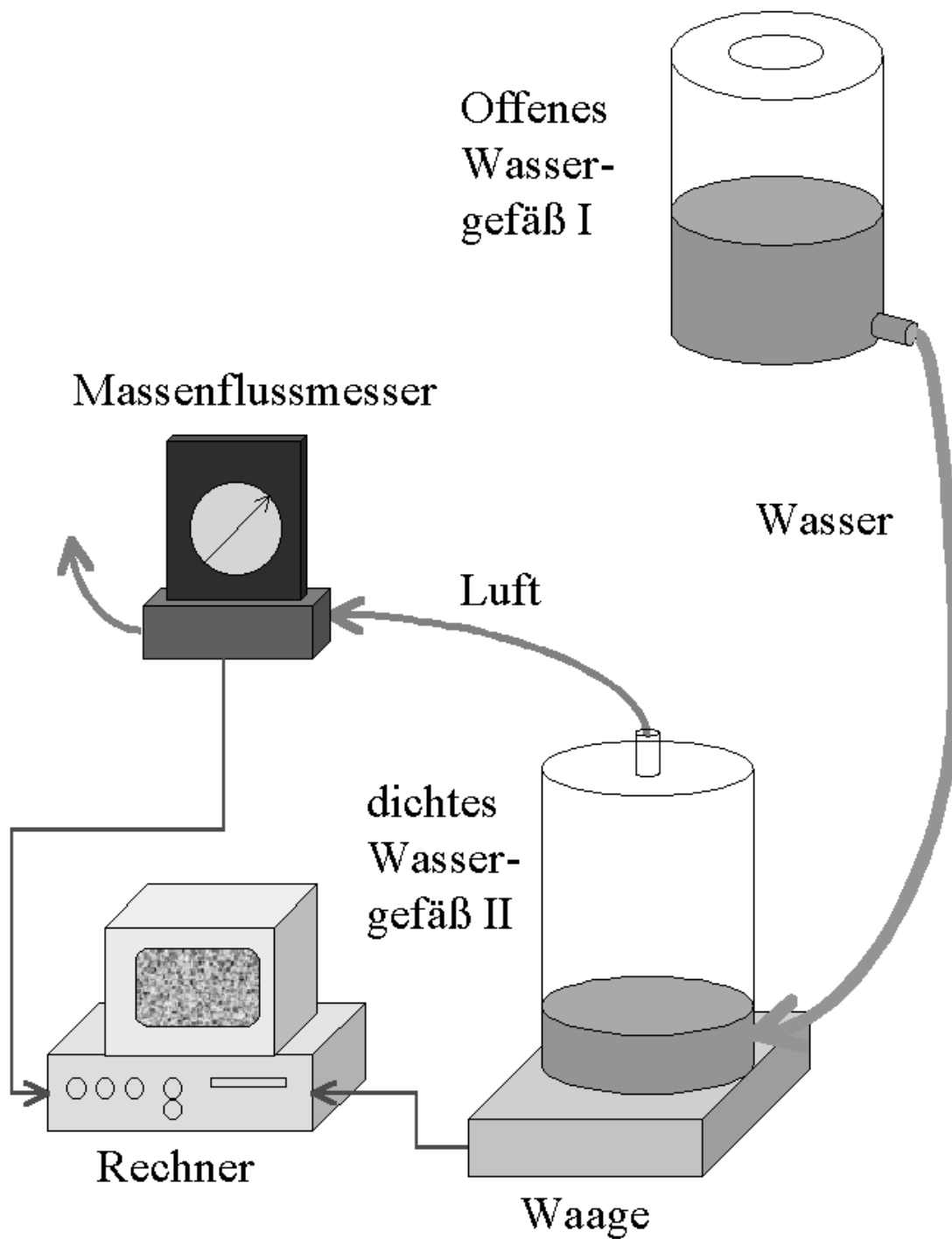


Abbildung 14: Schema der Kalibrierung eines Flussmessers. Wasser bekannter Dichte fließt in den unteren Behälter und verdrängt dort sein Volumen an Luft. Diese wird durch den Massenflussmesser geleitet. Ein Rechner nimmt die Werte auf.

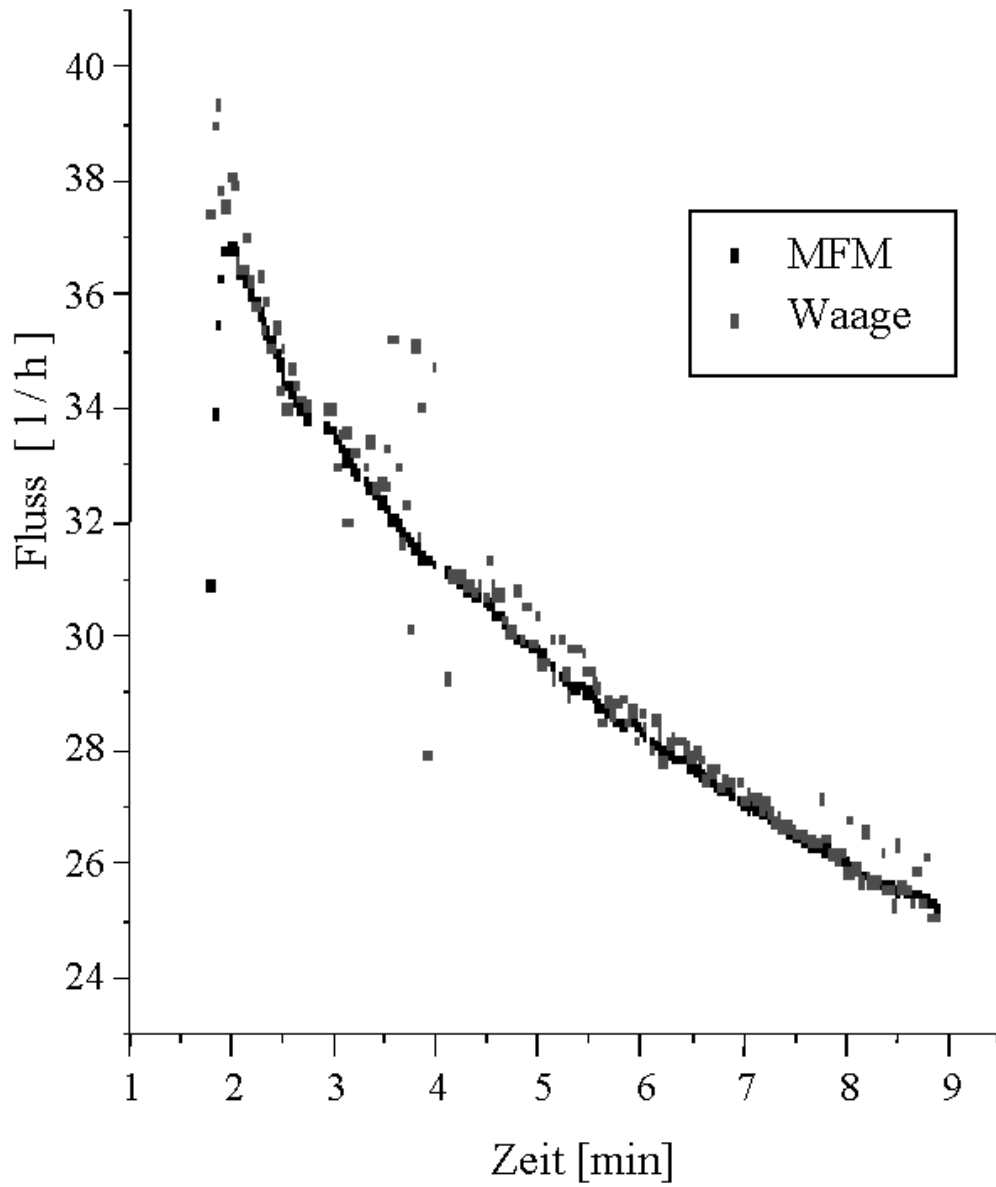


Abbildung 15: Beispielmessung: Vergleich von Originaldaten des Flusses ermittelt mit dem Massenflussmesser (MFM) und der Waage.

### 2.7.2.11 Einsatz der Massenflussmesser

Für möglichst genaue und untereinander vergleichbare Messungen der Stoffwechselrate ist die kontinuierliche Registrierung des Volumenstroms in jeder einzelnen Küvette notwendig. Da die fünf Kanäle sequenziell gemessen werden, stellt sich folgendes Problem: Während der Messung (Messfluss) ist der Volumenstrom gegenüber der übrigen Zeit (Leerfluss) verringert. Dies ist bedingt durch den höheren pneumatischen Widerstand im Messsystem. Der Hauptflussmesser kann aber nur in der Messzeit den Fluss des jeweiligen Kanals (Messfluss) aufnehmen, der Volumenstrom (Leerfluss) in der übrigen Zeit bleibt unbekannt. Deshalb kommen zusätzliche Massenflussmesser in jedem einzelnen Messkanal zum Einsatz, die über die gesamte Zeit registrieren. Parallel wird weiterhin während der Messung mit dem Hauptmassenflussmesser gearbeitet. Abbildung 16 zeigt das Schema der Flussbestimmung.

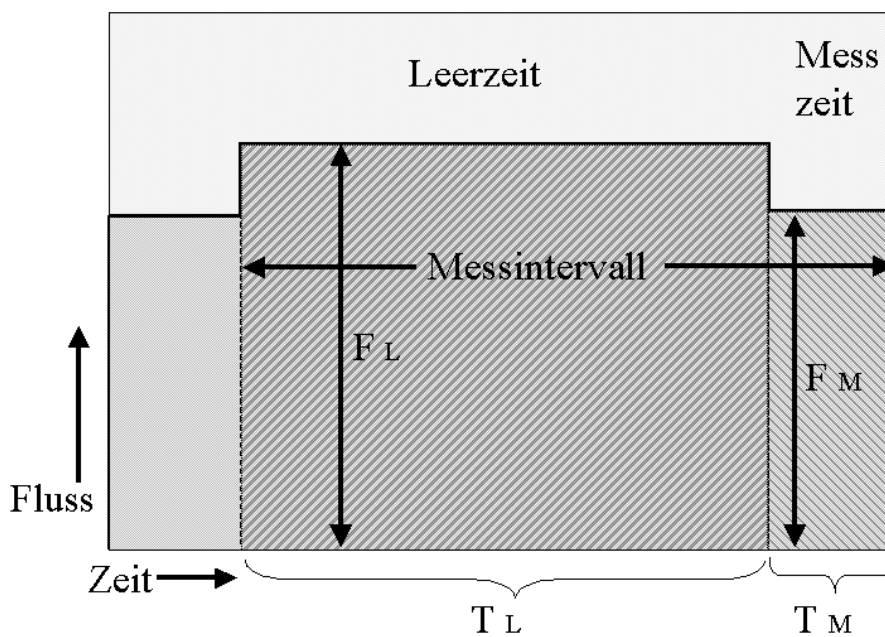


Abbildung 16: Schema der Verhältnisse an einem Massenflussmesser, das gepumpte Gesamtvolumen ( $V_G$ ) während eines Messintervalls ist schraffiert dargestellt. In der Leerzeit ist der Fluss höher als in der Messzeit, während der das analytische System einen Widerstand darstellt.

In der Praxis erreichen die Massenflussmesser der einzelnen Kanäle allerdings nicht die Genauigkeit und Stabilität des Hauptmassenflussmessers. Hinzu kommt, dass es sich um unabhängige Messgeräte handelt, deren Ergebnisse sich eventuell unterscheiden und daher nicht davon ausgegangen werden kann, dass sie vergleichbar sind. Während der Leerzeit sind sie aber die einzige Möglichkeit den Fluss, d.h. die Luftmenge pro Zeiteinheit, eines Kanals zu registrieren. Um dieses Problem zu lösen, werden die einzelnen Flussmesser dazu verwendet, das Verhältnis zwischen Leerfluss und Messfluss eines Kanals zu bestimmen und daraus einen Korrekturfaktor ( $f$ ) zu berechnen. Dies geschieht unter der Voraussetzung, dass die einzelnen Flussmesser linear arbeiten. Mit der Kenntnis des Leerflusses ( $F_L$ ) und Messflusses ( $F_M$ ), der Zeitdauer der jeweiligen Flüsse ( $T_L$ ,  $T_M$ ) und des exakten Messflusses, gemessen mit dem Hauptflussmesser ( $F_H$ ) lässt sich der Fluss ( $F$ ) während des gesamten Messintervalls berechnen (Gleichung 15). Das erfolgt über das gepumpte Gesamtvolumen im Messintervall ( $V_G$ ) und den daraus ermittelten durchschnittlichen Fluss ( $F_D$ ). Abbildung 17 zeigt die Beziehungen der Größen.

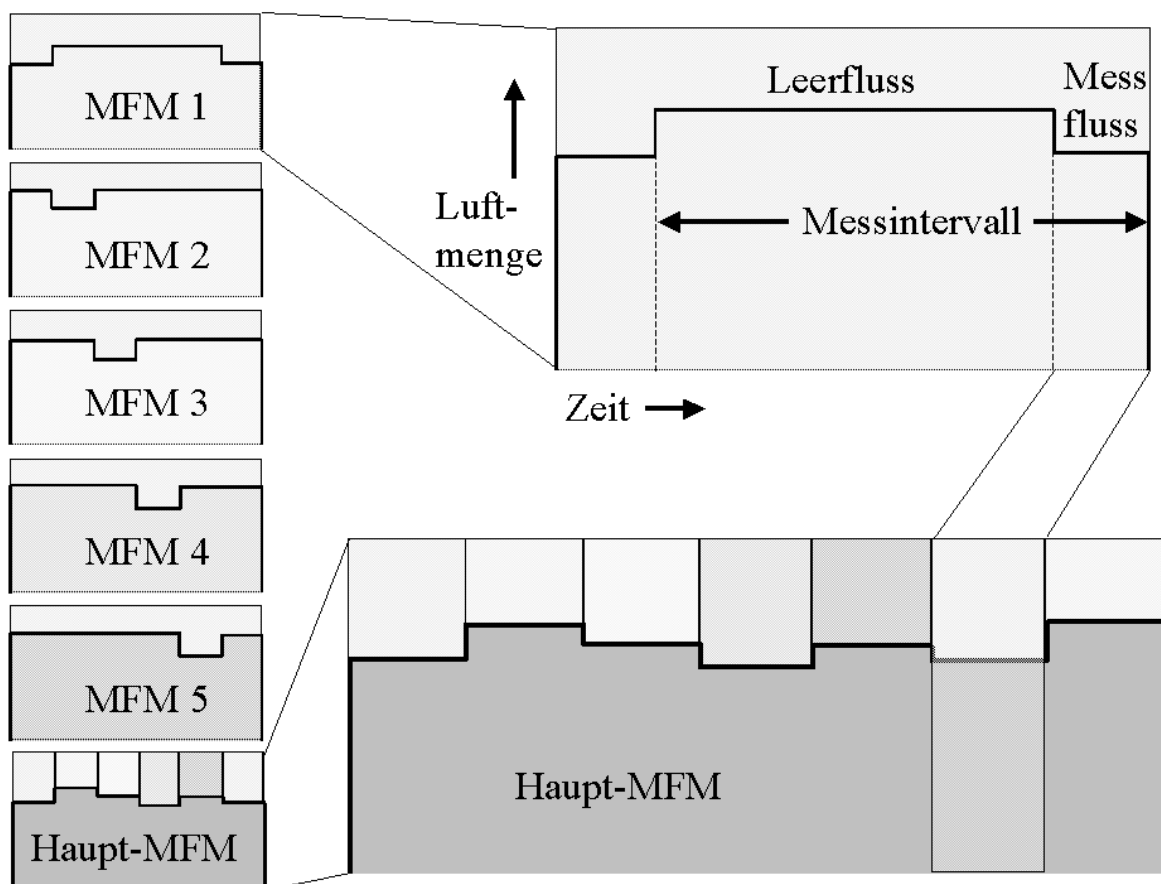


Abbildung 17: Schema der Volumenstromregistrierung. Der Hauptmassenflussmesser registriert den jeweiligen Messfluss während die Massenflussmesser die einzelnen Kanäle kontinuierlich aufnehmen.

$$V_G = (F_L \cdot T_L) + (F_M \cdot T_M) \quad \text{Gleichung 13}$$

$$F_D = \frac{V_G}{T_L + T_M} \quad \text{Gleichung 14}$$

$$f = \frac{F_D}{F_M} \quad \text{Gleichung 15}$$

$$F = f \cdot F_H \quad \text{Gleichung 16}$$

Zusammengefasst:

$$F = \frac{F_H}{F_M} \cdot \frac{(F_L \cdot T_L) + (F_M \cdot T_M)}{T_L + T_M} \quad \text{Gleichung 17}$$

Auf diese Weise lassen sich genaue und untereinander vergleichbare Flussmessungen anstellen.

#### 2.7.2.12 *Volumenfehler durch den RQ*

Der respiratorische Quotient (RQ) beschreibt das Verhältnis von ausgeatmetem Kohlendioxid zu eingeatmetem Sauerstoff. Abhängig von der energieliefernden Stoffklasse bewegt sich das Verhältnis zwischen 0,7 und 1. Unter bestimmten physiologischen Bedingungen werden diese Werte noch deutlich über- bzw. unterschritten (Schmidt & Thews, 1995). So sinkt der RQ, wenn ein Tier über lange Zeit hungert oder steigt über eins wenn Fett eingelagert wird. Durch körperliche Anstrengung kann es zu einer metabolischen Azidose kommen, hierbei kommt es zu anaeroben Prozessen, die den RQ beeinflussen. Hyperventilation erhöht den RQ ebenfalls kurzfristig, gefolgt von einer Verringerung des Quotienten. Auch können starke Körpertemperaturerhöhungen, wie sie bei Winterschläfern auftreten, den RQ erhöhen, da das in den Flüssigkeiten gelöste CO<sub>2</sub> ausgetrieben wird. Ein RQ, der von eins abweicht, bedeutet aber eine Veränderung des Gesamtvolumens. In Abbildung 18 ist dies schematisch dargestellt:

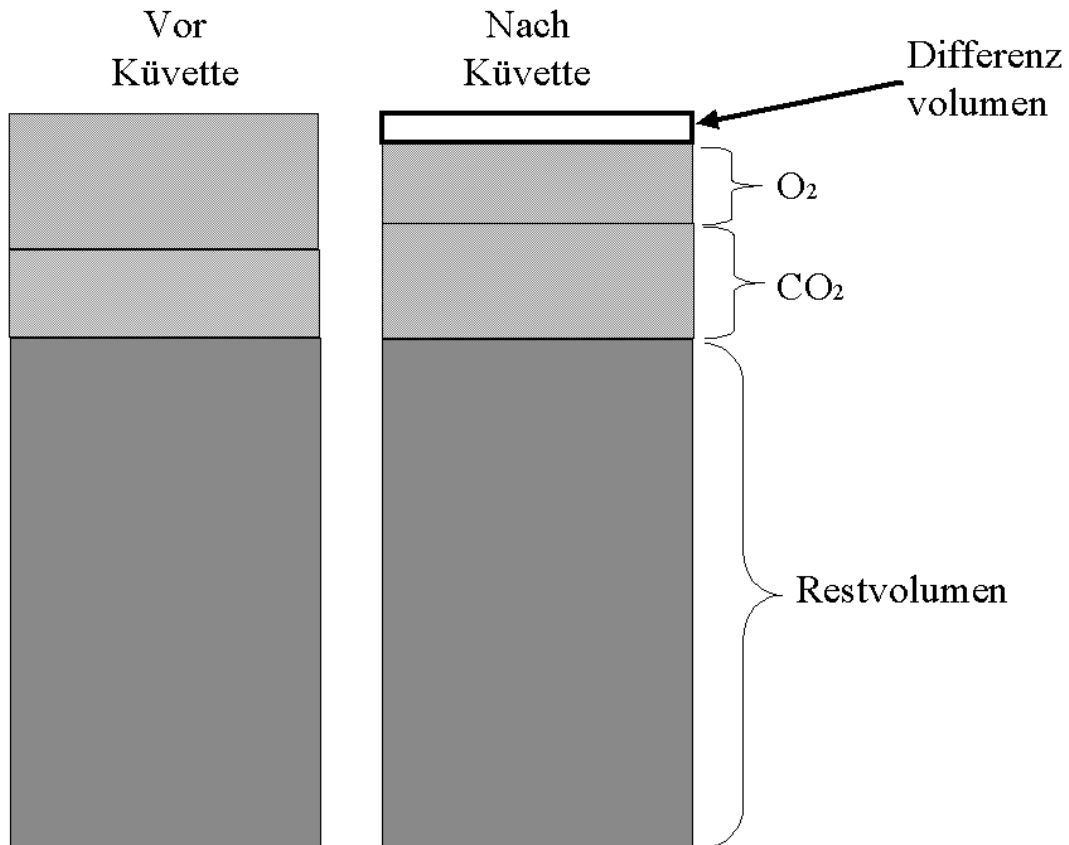


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Volumenzusammensetzung und Menge vor und nach einer Atemgasmessung. Bei einem RQ unter 1, wie in diesem Beispiel, ergibt sich ein negatives Differenzvolumen, liegt der RQ über eins ist das Volumen nach der Messung größer.

Da sich die Atemgasmessungen auf das Gesamtvolumen beziehen, bedeutet eine Veränderung dieses Volumens auch eine Veränderung der Messergebnisse. Aus den gemessenen Werten lassen sich die tatsächlichen Volumina wieder herleiten.

Gemessen wird das Volumen nach Passage der Messkammer ( $V_N$ ) sowie die Konzentrationen von  $O_2$  und  $CO_2$  vor ( $K_{V,O_2}$ ), ( $K_{V,CO_2}$ ) und nach ( $K_{N,O_2}$ ), ( $K_{N,CO_2}$ ) der Küvette. Aus diesen Werten lässt sich das unbeteiligte Restvolumen ( $V_{Rest}$ ) sowie die Volumina der Atemgase nach dem Tier ( $V_{N,O_2}$ ), ( $V_{N,CO_2}$ ) berechnen, hierbei geht die jeweilige Konzentration ( $K$ ) als dimensionslose Zahl zwischen null und eins ein:

$$V_{N,O_2} = V_N \cdot K_{N,O_2} \quad \text{Gleichung 18}$$

$$V_{N,CO_2} = V_N \cdot K_{N,CO_2} \quad \text{Gleichung 19}$$

$$V_{Rest} = V_N \cdot (1 - (K_{N,O_2} + K_{N,CO_2})) \quad \text{Gleichung 20}$$

Aus der Kenntnis des Restvolumens ( $V_{\text{Rest}}$ ) und der Konzentrationen der Atemgase vor dem Tier ( $K_{V,O_2}$ ), ( $K_{V,CO_2}$ ), lassen sich deren Volumina ( $V_{V,O_2}$ ), ( $V_{V,CO_2}$ ) und somit das Gesamtvolumen vor dem Tier ( $V_V$ ) ermitteln:

$$V_V = V_{\text{Rest}} + V_{V,O_2} + V_{V,CO_2} \quad \text{Gleichung 21}$$

$$V_{V,O_2} = \frac{V_{\text{Rest}} \cdot K_{V,O_2}}{1 - (K_{V,O_2} + K_{V,CO_2})} \quad \text{Gleichung 22}$$

$$V_{V,CO_2} = \frac{V_{\text{Rest}} \cdot K_{V,CO_2}}{1 - (K_{V,O_2} + K_{V,CO_2})} \quad \text{Gleichung 23}$$

Da nun die tatsächlichen Volumina vor und nach dem Tier bekannt sind, lässt sich der Sauerstoffverbrauch ( $V_{O_2}$ ) und die Kohlendioxidproduktion ( $V_{CO_2}$ ) sowie der RQ korrekt berechnen:

$$V_{O_2} = \frac{V_N \cdot K_{V,O_2} \cdot (1 - (K_{N,O_2} + K_{N,CO_2}))}{1 - (K_{V,O_2} + K_{V,CO_2})} - V_N \cdot K_{N,O_2} \quad \text{Gleichung 24}$$

$$V_{CO_2} = V_N \cdot K_{N,CO_2} - \frac{V_N \cdot K_{V,CO_2} \cdot (1 - (K_{N,O_2} + K_{N,CO_2}))}{1 - (K_{V,O_2} + K_{V,CO_2})} \quad \text{Gleichung 25}$$

$$RQ = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}} \quad \text{siehe: Gleichung 4}$$

Diese Berechnung ist besonders relevant bei niedrigen Flüssen, hohem Metabolismus der Tiere und extremen RQ-Werten. Legen wir beispielsweise einen Fluss von 20 l/h zugrunde, mit dem ein aus dem Winterschlaf aufwachender Siebenschläfer von 150 g Körpergewicht, einem  $O_2$ -Verbrauch von  $10 \text{ mlO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und einem RQ von zwei gemessen wird. Der Volumenfehler, der sich aus dieser extremen Konstellation ergibt, beträgt 7,5% des Gesamtvolumens. Es werden, statt der tatsächlich in die Küvette geleiteten 20 l/h, 21,5 l/h gemessen.



### 2.7.3 Gasanalyse

Mit der Gasanalyse werden die Konzentrationen der Atemgase bestimmt. Bei dem gezeigten Aufbau geschieht dies mit einem kommerziellen Analysator (Mulptor 610, Maihak), der sowohl Sauerstoff als auch Kohlendioxid messen kann.

Nach der Bestimmung des Volumenstroms wird nicht mehr die gesamte Gasmenge benötigt, lediglich ein Aliquot zur Bestimmung der Konzentrationen der Atemgase ist nötig. Hinzu kommt, dass die Anlage bis hier mit Überdruck betrieben ist, was bei den Massenflussmessern kein Problem darstellt. Bei der Gasanalyse muss druckfrei gearbeitet werden. Daher wird das Messgas über einen Überströmer dem Analysator zugeführt. Der Aufbau besteht aus einem dicken Schlauch (InnenØ 10 mm), in den der verwendete, dünnere Tygenschlauch (AußenØ 5,6 mm) etwa 100 mm tief eingesteckt wird. Der Spalt zwischen den Schläuchen lässt die Messluft frei abfließen, wodurch die Druckfreiheit erreicht wird. Durch die Überlappungslänge der Schläuche ist ein Eindiffundieren von Umgebungsluft ausgeschlossen. Aus diesem Pool an Messluft kann nun das Aliquot zur Gasmessung mit der eingebauten Pumpe (Fluss: 10 l/h) des Mulptor gewonnen werden. In diesem wird das Gas nochmals gefiltert bevor es gemessen werden kann.

#### 2.7.3.1 Kohlendioxidmessung

Kohlendioxid wird über die Absorption von infraroter Strahlung gemessen. Über einen Strahlengang in einer 140 mm langen Küvette wird die Absorption der IR Strahlung ermittelt und mit einem Referenzwert verglichen. Daraus berechnet sich der Anteil des Kohlendioxid im Messgas. Diese Verfahren ist sehr langzeitstabil und relativ unempfindlich gegen Störgrößen. Querempfindlichkeiten bestehen jedoch mit allen IR absorbierenden Stoffen wie Wasserdampf oder Kohlenwasserstoffen. Eine vorgeschaltete Trocknung und u. U. ein Aktivkohlefilter sind deshalb empfehlenswert.

#### 2.7.3.2 Sauerstoffmessung

Sauerstoff kann auf elektrochemischem oder physikalischem Wege gemessen werden. Bei der chemischen Methode diffundiert Sauerstoff durch ein Elektrolyt an eine Elektrode wo er chemisch umgesetzt wird. Dabei werden elektrische Ladungen frei, die als Messstrom genutzt werden. Es handelt sich letztenendes um eine Batterie und wie diese verbraucht sich die Elektrode auch hier mit der Zeit. Problematisch ist auch die hohe Temperaturabhängigkeit der

Methode. Ein Vorteil ist der exakte Nullpunkt der Elektrode, da ohne Sauerstoff kein Strom fließt. Eine Nullpunktskalibrierung entfällt somit.

Das physikalische Messverfahren nutzt die paramagnetischen Eigenschaften des Sauerstoffs. In der verwendeten Variante des Analysators kommt es zum Einsatz. Eine paramagnetische Messzelle enthält ein Magnetfeld, in der eine diamagnetische Hantel frei drehbar aufgehängt ist. Eine opto-elektrische Kompensationseinrichtung sorgt dafür, dass die Hantel ständig in der Ruheposition gehalten wird. Die paramagnetische Eigenschaft des Sauerstoffs verändert in Abhängigkeit von der Konzentration das Magnetfeld in der Messkammer. Die notwendige Änderung in der opto-elektrischen Kompensation ist der Messeffekt, der ausgewertet wird. Damit wird eine Auflösung von 0,02 Vol% erreicht. Der Vorteil dieses Messprinzips ist ebenfalls eine große Langzeitstabilität, bei gleichzeitig hoher Auflösung und relativer Unempfindlichkeit gegen Störgrößen wie z.B. Temperatur.

### **2.7.3.3 Kalibrieren des Gasanalysators**

Trotz der erwähnten Langzeitstabilität der Messkomponenten empfiehlt es sich, in bestimmten Abständen den Multor zu kalibrieren. Dazu werden mit einer Gasmischpumpe (, Typ SA 27 2F, Wösthoff) bestimmte Konzentrationen der Atemgase in Umgebungsluft hergestellt und der Anlage zugeführt. Die Anzeige des Multor wird dann mit dem tatsächlichen Wert verglichen und gegebenenfalls korrigiert. Die Gasmischpumpe hat eine Fördermenge von 18,90 l/h und erlaubt Zumischungen von 1 bis 10 Vol%. Die Herstellung des Gasgemisches mit CO<sub>2</sub> erfolgt durch druckfreie Zufuhr von 100 Vol% CO<sub>2</sub>. Die Mischungen für O<sub>2</sub>, der ja im Gemisch fehlen soll, werden durch Zugabe von 100 Vol% Stickstoff erzielt, der den Sauerstoff verdrängt. So wird der Sauerstoffgehalt von ursprünglich 20,958 Vol% in der Atmosphäre bei Zugabe von 10 Vol% N<sub>2</sub> um  $20,958 \text{ Vol\%} / 10$ , also um 2,096 Vol% auf 18,862 Vol% O<sub>2</sub> reduziert.

### **2.7.4 Auflösungsvermögen der Anlage**

Das Auflösungsvermögen der Anlage ergibt sich aus der Genauigkeit der Atemgasmessung und des Flussmessers. Das Rauschen der paramagnetischen Sauerstoffmessung wird mit maximal 0,02 Vol% O<sub>2</sub> angegeben, das der Kohlendioxidmessung mit 1 % der kleinsten Messspanne. Der Analysator arbeitet mit zwei einstellbaren Messbereichen für CO<sub>2</sub>, die in unserem Fall mit 0 bis 1 Vol% CO<sub>2</sub> und 1 bis 10 Vol% CO<sub>2</sub> eingestellt sind. Hieraus ergibt

sich eine Genauigkeit von 0,01 Vol% CO<sub>2</sub>. In der Praxis zeigt sich allerdings, dass das Rauschen des CO<sub>2</sub> Kanals etwa um den Faktor 10 geringer ist. Eine interne Dämpfung mittelt die Signale des O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> Kanals in der verwendeten Variante über 10 s, was zu einer zusätzlichen Beruhigung des Messwertes führt. Die Datenübermittlung zwischen Multor und Rechner geschieht über eine serielle Schnittstelle, wodurch zusätzliche Ungenauigkeiten vermieden werden, wie sie etwa bei einem stromcodierten Ausgang auftreten können.

Das maximale Rauschen des Hauptflussmessers wird mit 0,5 % des Messbereichs angegeben. Bei einer Messspanne von 0 bis 60 l/h sind das 0,3 l/h. Das Datenakquisitionsprogramm mittelt während der gesamten Messzeit eines Kanals die Werte des Massenflussmessers. Dadurch werden Störungen, wie etwa Schwankungen der Pumpenleistungen eliminiert und die Genauigkeit nochmals erhöht.

Das Auflösungsvermögen berechnet sich aus dem Produkt der Abweichungen.

$$\text{Sauerstoff: } 0,02 \text{ Vol\%O}_2 \cdot 0,31/\text{h} = 0,06 \text{ mlO}_2/\text{h}$$

$$\text{Kohlendioxid: } 0,01 \text{ Vol\%CO}_2 \cdot 0,31/\text{h} = 0,03 \text{ mlCO}_2/\text{h}$$

Der zu erwartende Sauerstoffverbrauch von torpiden Hamstern liegt bei 0,8 ml\*g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) (Heldmaier und Steinlechner, 1981). Bei einem niedrig gewählten Körpergewicht von 20 g ergibt sich daraus ein Sauerstoffverbrauch von 16 ml/h. Bei einem Fehler von in diesem Fall 0,4 % ist die theoretische Auflösung der Anlage für die angestrebte Anwendung ausreichend. In der Praxis hängt die Genauigkeit von vielen weiteren Faktoren, wie Temperatur oder Feuchtigkeit ab, die so konstant wie möglich gehalten werden sollten.

Das zeitliche Auflösungsvermögen der Anlage wird hauptsächlich durch das Küvettenvolumen (V), den Fluss (F) und die Länge der Schlauchleitungen bestimmt. Dies ist bei der Wiederholrate der Messungen zu berücksichtigen, um auch alle Ereignisse aufnehmen zu können. Der vorhandene Aufbau verfügt über Küvetten mit 5 l Volumen und nimmt alle fünf Minuten einen Datenpunkt bei einem Fluss von zumeist 30 l/h auf. Damit ist ein guter Kompromiss zwischen Dämpfung durch das System und möglicher Auflösung gefunden. Die Überprüfung der zeitlichen Auflösung ist durch folgende Berechnung möglich. Grundlage ist eine Methode von Bartholomew et al. (1981) mit der die Bestimmung des stationären Zustands (M<sub>eq</sub>) aus dem momentanen Sauerstoffverbrauchs (M<sub>t</sub>) möglich ist.

Allgemein gilt:

$$M(t) = M_{eq} - (1 - e^{-\frac{F}{V}t})$$

Gleichung 26

Für zwei um  $\Delta t$  versetzte Messzeitpunkte  $t_1$  und  $t_2$  ( $t_2 - t_1 = \Delta t$ ) gilt dann:

$$\frac{M(t_2) - M(t_1)}{M_{\text{eq}} - M(t_1)} = 1 - e^{-\frac{F}{V} \Delta t} = Z \quad \text{Gleichung 27}$$

$Z$  bezeichnet den Anteils am Gleichgewichtszustand der Messgröße ( $M_{\text{eq}}$ ), der innerhalb des Messintervalls ( $\Delta t$ ) erreicht wird. Durch Auflösen nach  $M_{\text{eq}}$  lässt sich aus den beiden aufeinander folgenden Messungen der Gleichgewichtszustand errechnen:

$$M_{\text{eq}} = \frac{M_t - M_{t-1}}{Z} + M_{t-1} \quad \text{Gleichung 28}$$

Ein Vergleich des errechneten Gleichgewichtszustands mit den gemessenen Daten erlaubt Rückschlüsse auf die Trägheit des Aufbaus.

## 2.7.5 Computer

Der Computer steuert das indirekte Kalorimeter, berechnet die Werte und speichert sie ab. Um über lange Zeit automatisch Messen zu können, wurde ein Steuerungs- und Datenakquisitionsprogramm entwickelt.

### 2.7.5.1 Hardware

Ein PC (80486, 100 MHz, 16 MB) kommuniziert mit den einzelnen Komponenten. Der Gasanalysator (Multor, Maihak) geht über eine serielle Schnittstelle ein. Die Ansteuerung der Relaiskarte (Centronics, Conrad) erfolgt über die parallele Schnittstelle. Über die Analog/Digital-Wandler Karte (CIO-DAS08, Plug-in) in einem Steckplatz des ISA Busses des Rechners ist der 32 Kanal Multiplexer (CIO-EXP32, Plug-in) angeschlossen. Mit ihm werden die Spannungssignale aller Flussmesser ausgelesen.

### 2.7.5.2 *Software*

Es wurde eigens ein Computerprogramm (QuickBasic7.0, Microsoft) entwickelt. Dieses steuert die Anlage, erfasst die Daten, führt die in dieser Arbeit erläuterten Rechnungen durch und speichert die Messwerte ab. Im Folgenden sollen die Schritte des Programms erklärt werden.

Das Programm startet nach Einschalten des Rechners automatisch, so werden Messausfälle durch zeitweilige Stromausfälle, wie sie im Tierhaus der Zoologie vorkommen, verringert. Nun werden die Parameter der zu messenden Tiere und der gewünschte Dateiname abgefragt. Wird binnen einer bestimmten Zeitspanne kein Wert eingegeben, so greift das Programm auf zuvor definierte Werte zurück. Für jedes Tier wird nun ein eigenes Verzeichnis angelegt und eine Datei geöffnet. Während dieser Zeit ist bereits die Vergleichsgaspumpe angeschaltet worden und der Gasanalysator ermittelt die Konzentrationen der Umgebungsluft. Nach vier Minuten werden die Daten als Referenzwert abgespeichert und die Vergleichsgaspumpe abgeschaltet. Alle Messungen beziehen sich nun auf diese Werte bis nach 30 Durchgängen die Referenzwerte neu bestimmt werden. Nun werden für jeweils eine Minute in sich wiederholenden Zyklen die fünf Kanäle mit den Tieren gemessen. Dazu wird das entsprechende Ventil geschaltet und der Luftfluss durch die Messanordnung geleitet. Während dieser Zeit werden permanent alle Flussmesser ausgelesen und bereits online gemittelt. Nach Ablauf der Minute wird der Gasanalysator ausgelesen und zusammen mit den gemittelten Werten der Flussmesser in beschriebener Weise der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidproduktion berechnet. Diese Daten werden zusammen mit der Uhrzeit und den Rohdaten direkt in das geöffnete File auf der Festplatte geschrieben. Damit können die Daten auch bei Ausfall des Rechners nicht verloren gehen. Nun wird der nächste Kanal durch Umschalten der Ventile aufgerufen. Der Ablauf dieses Programms ist in Abbildung 19 schematisiert dargestellt.

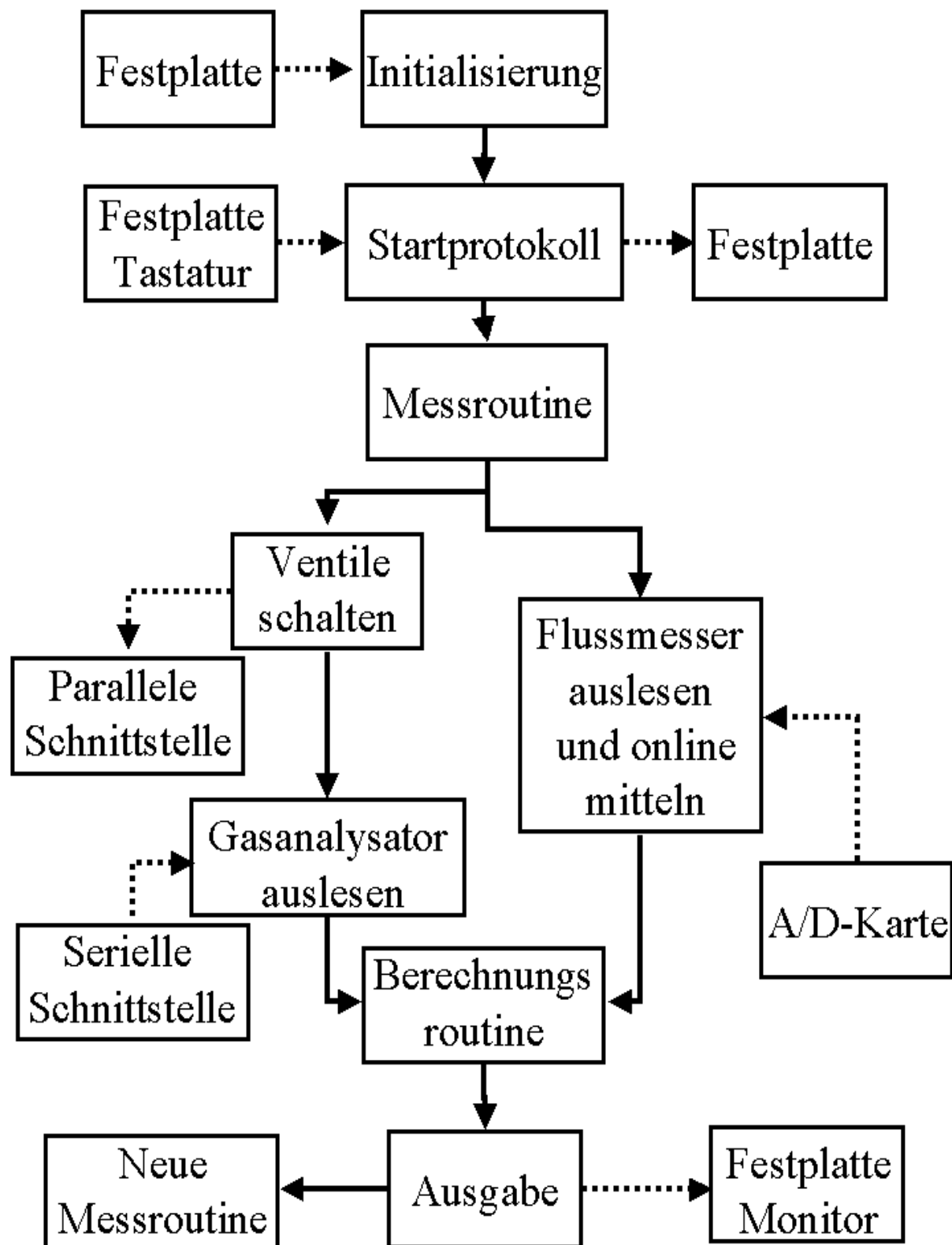


Abbildung 19: Schema des Programmablaufes zur Steuerung und Datenakquisition. Die durchgezogenen Pfeile zeigen die Programmschritte, die gestrichelten Pfeile die Kommunikation mit der Peripherie.

Alle fünf Minuten ergibt sich so für jedes Tier eine Messung. Zum Beenden wird das Programm einfach an beliebiger Stelle unterbrochen. Die Daten sind bereits als kompakte „comma separated values“ (csv) Dateien abgespeichert. Zum Übertragen der Daten für die Auswertung wird ein Programm genutzt, das die Dateien automatisch komprimiert, auf eine Diskette kopiert und daraufhin das Messprogramm wieder startet.

## **2.8 Aufgenommene physiologische Parameter und Auswertung**

Bei den zwei Spezies wurden folgende physiologische Parameter aufgenommen: Die Zwerghamster bekamen Sender für die Registrierung des EKGs und der Körperkerntemperatur implantiert. Zusätzlich wurden die Bewegungsaktivität sowie der Sauerstoffverbrauch und der respiratorische Quotient gemessen.

Bei den Mäusen setzten sich die Parameter aus Bewegungsaktivität, Sauerstoffverbrauch und respiratorischem Quotienten zusammen. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Mäuse und der Problematik mit Bindegewebe wurde hier auf Implantationen verzichtet.

Die Auswertung der Daten geschah mit Hilfe einer Datenbank (Access, Microsoft) und eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel, Microsoft), die Statistik wurde mit einem entsprechenden Programm (StatView, SAS) erarbeitet. Im Wesentlichen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit einem Post Hoc Test (Scheffe) verwendet. War der zu erwartende Fehler kleiner als fünf Prozent, wurde das Ergebnis als signifikant bezeichnet.

### **3 Ergebnisse**

Im ersten Teil der Ergebnisse wird exemplarisch das Zusammenspiel verschiedener physiologischer Parameter eines Zwerghamsters unter Kurztagbedingungen gezeigt. Ein Ausschnitt von drei Tagen unter Kurztagbedingungen wird zugrunde gelegt und daran die gemessenen physiologischen Parameter Bewegungsaktivität, Körpertemperatur, Sauerstoffverbrauch, respiratorischer Quotient und Herzfrequenz unter den circadian wechselnden Gegebenheiten gezeigt.

Der zweite Teil behandelt die Beobachtungen an drei Gruppen von Mäusen, die unter verschiedenen Periodenlängen gehalten wurden. Hier wurden die Parameter Bewegungsaktivität, Sauerstoffverbrauch und respiratorischer Quotient gemessen. Die periodischen Größen Periodenlänge und Rhythmusstabilität werden berechnet und in den Kontext mit den aufgenommenen physiologischen Parametern gestellt.

#### **3.1 Zwerghamster**

Die mit zwei Sendern implantierten Hamster hatten sich innerhalb von zwei Wochen komplett von dem Eingriff erholt. Die Messungen zeigten, dass von den 12 implantierten Tieren vier Hamster torpid wurden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen bei den nicht implantierten aber ebenfalls unter Kurztagbedingungen gehaltenen Zwerghamstern (Heldmaier und Steinlechner, 1981). Im Folgenden soll anhand eines Abschnitts von drei Tagen die Interaktion der verschiedenen physiologischen Parameter eines Hamsters unter Kurztagbedingungen exemplarisch dargestellt werden.



### 3.1.1 Bewegungsaktivität

Als erster Parameter soll die Bewegungsaktivität gezeigt werden.

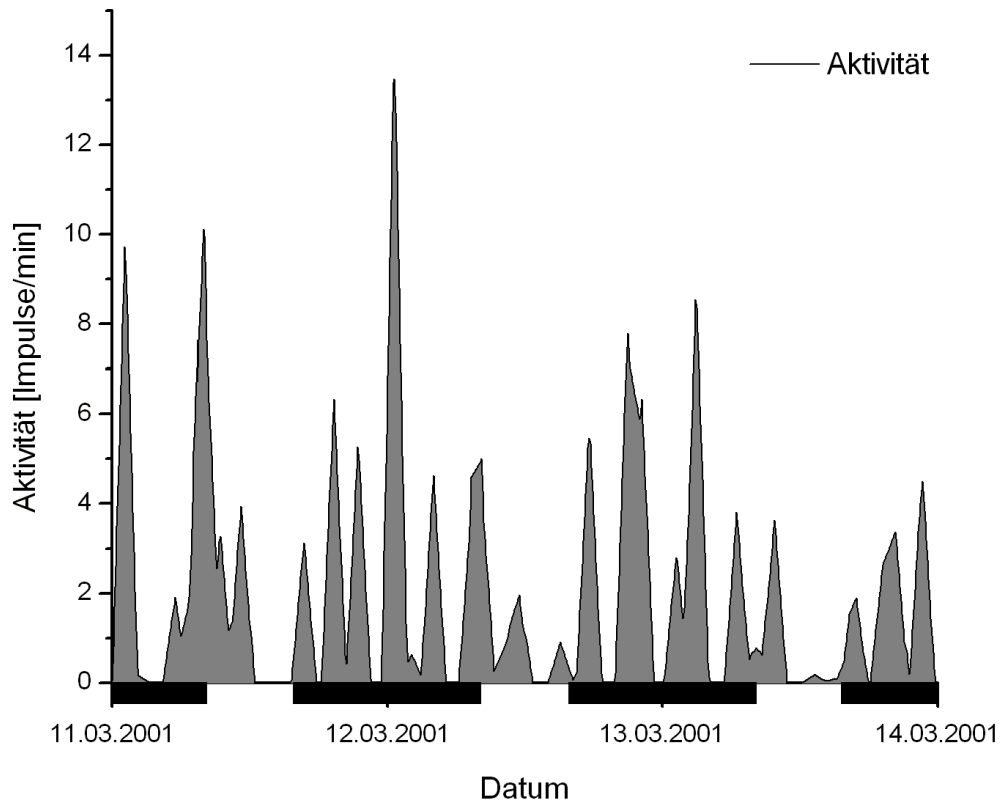


Abbildung 20: Bewegungsaktivität eines Zwerghamsters unter Kurztagbedingungen L:D 8:16. Die schwarzen Balken symbolisieren Dunkelheit.

Abbildung 20 zeigt das Bewegungsmuster des Tieres ab dem 11.03.2001 0:00 Uhr bis zum 14.03.2001 0:00 Uhr. Das Lichtregime ist durch schwarze Balken symbolisiert. Gezählt wurden die Impulse eines Bewegungsmelders pro Minute.

Die Aktivität des nachtaktiven Tieres weist einen tagesperiodischen Verlauf auf. Die meiste Aktivität kann nachts registriert werden. Allerdings sind die Hamster auch während der Ruhephase ( $\rho$ ) am Tag aktiv, dann aber mit geringeren Amplituden. Auffällig ist, dass das Ausschalten des Lichts jeweils mit einer deutlichen Aktivitätserhöhung beantwortet wird. Der tagesperiodische Verlauf der Aktivität ist von einem ultradianen Rhythmus von etwa 3,5 h Periodenlänge überlagert, der die Aktivität auch während der Aktivitätsphase ( $\alpha$ ) segmentiert.

### 3.1.2 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich im 6 min Abstand telemetrisch registriert.

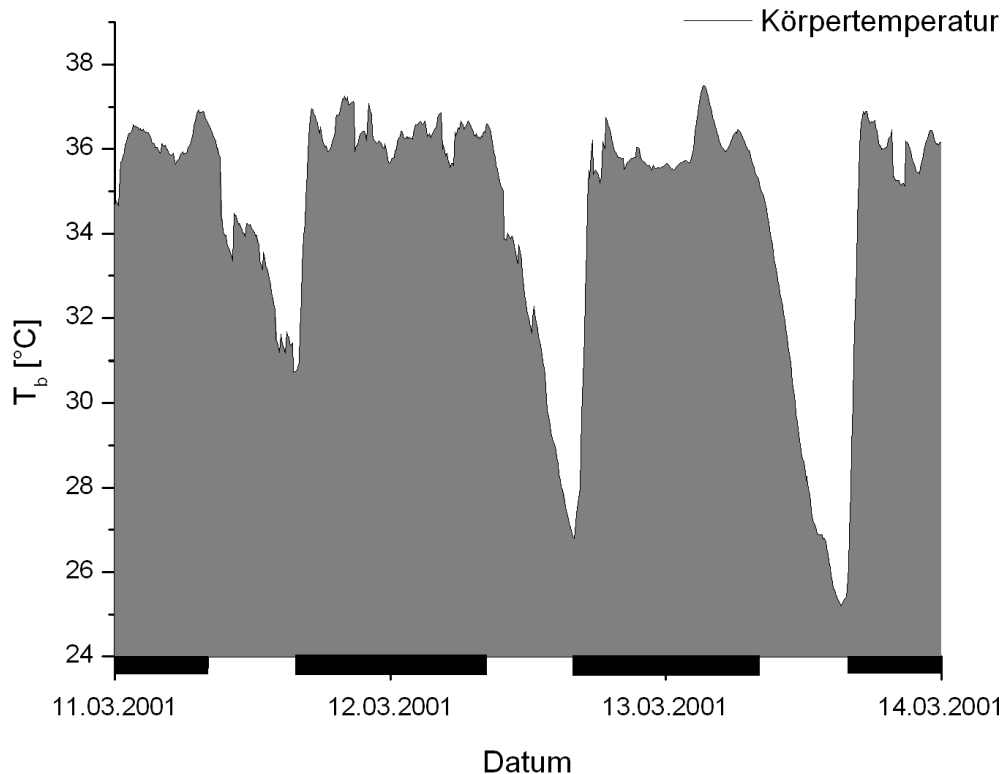


Abbildung 21: Verlauf der Körperkerntemperatur eines Zwerghamsters unter Kurztagbedingungen L:D 8:16. Die schwarzen Balken symbolisieren Dunkelheit. Deutlich ist das regelmäßige Absenken während der Ruhephasen ( $\rho$ ) und der Anstieg zu Beginn der Aktivitätsphase ( $\alpha$ ) zu sehen.

Abbildung 21 zeigt den Verlauf der Körpertemperatur über denselben Zeitraum wie die oben dargestellte Bewegungsaktivität.

Dieser Hamster zeigte regelmäßig Torpor während der Ruhephase( $\rho$ ), also der Zeit, in der das Licht an war. Das Absenken der Körperkerntemperatur begann jeweils mit dem Ende der Dunkelphase ( $\alpha$ ). Die Temperatur sank von dem Normothermie Niveau von ca. 37 °C bis auf 25 °C im Torpor am 13.03. ab. Auffällig ist, dass die tiefste jeweils erreichte Temperatur stark variiert. Betrachtet man die abfallenden Flanken des Temperaturprofils, so fallen die kurzfristigen Erwärmungen auf. Je massiver solche Ereignisse während des Auskühlens auftraten, umso höher war die tiefste Torportemperatur. Der Verlauf der Auskühlkurven zeigt in den beiden ersten Fällen einen eher linearen und keinen exponentiell abfallenden Verlauf wie es bei einem „einfachen“ Auskühlen zu erwarten gewesen wäre.

Mit Beginn der Aktivitätsphase ( $\alpha$ ) und Abdunkelung der Klimakammer stieg die Körpertemperatur innerhalb einer Stunde wieder auf Normothermie. Es ist sogar jeweils ein leichtes Überschießen und anschließendes Einregeln zu erkennen. Während der Normothermiephasen ist auch wieder ein ultradianer Rhythmus zu erkennen, allerdings nicht so deutlich wie bei der Bewegungsaktivität.

### 3.1.3 Sauerstoffverbrauch

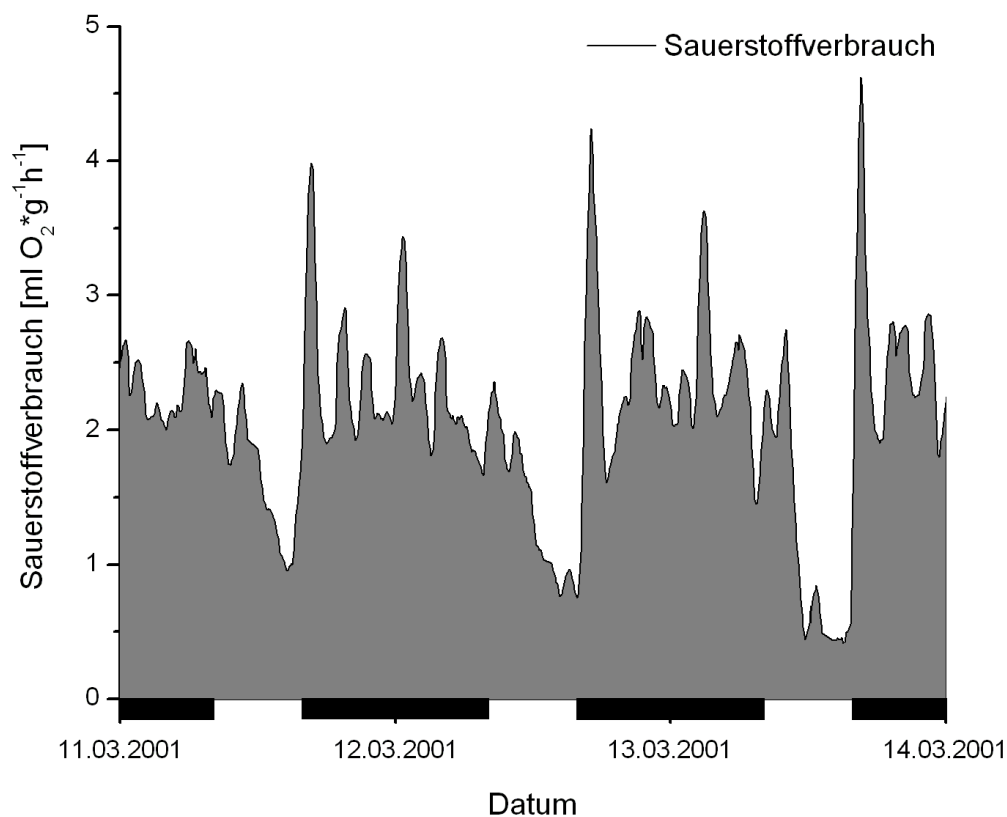


Abbildung 22: Verlauf des Sauerstoffverbrauchs eines Zwerghamsters unter Kurztagbedingungen L:D 8:16. Die schwarzen Balken symbolisieren Dunkelheit. Deutlich ist das regelmäßige Absenken während der Ruhephasen ( $\rho$ ) und der sprunghafte Anstieg zu Beginn der Aktivitätsphase ( $\alpha$ ) zu erkennen.

Abbildung 22 zeigt den Verlauf des Sauerstoffverbrauchs über den Zeitraum. Deutlich ist die starke Dynamik von  $0,5 \text{ ml O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  bis zu annähernd  $5 \text{ ml O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Die niedrigsten Werte werden am Ende des Torpors gemessen, die höchsten unmittelbar darauf zu Beginn der Aktivitätsphase. Die Variation während der anschließenden Aktivitätsphase ist nicht mehr so stark. Die Sauerstoffverbrauchswerte variieren zwischen 2 und  $3 \text{ ml O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Auch hier lässt

sich ein ultradianer Rhythmus finden. Auffällig ist, dass der Sauerstoffverbrauch während des Torpors am 11. und 12.03. linear absinkt bis er am Ende des Torpors seinen niedrigsten Wert erreicht. Dagegen fällt am 13.03. der Sauerstoffverbrauch bereits kurz nach Beginn der Ruhephase auf seinen niedrigsten Wert, der auch geringer ist als in den vorausgegangenen Tagen.

### 3.1.4 Respiratorischer Quotient

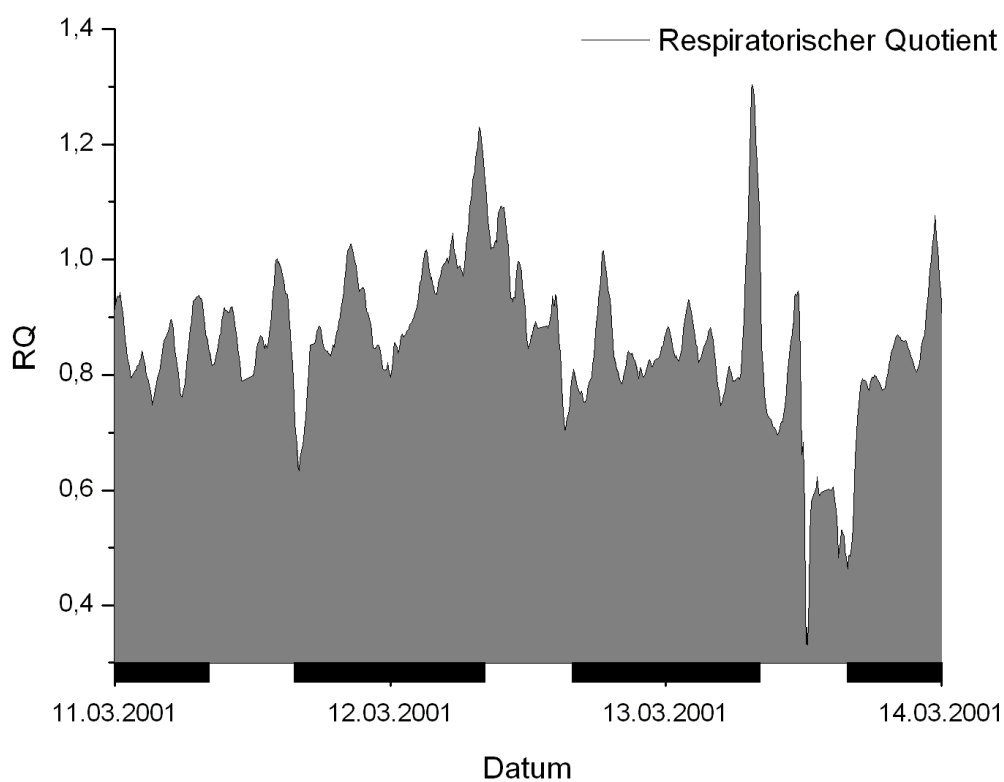


Abbildung 23: Verlauf des respiratorischen Quotienten eines Zwerghamsters unter Kurztagbedingungen L:D 8:16. Die schwarzen Balken symbolisieren Dunkelheit. Deutlich ist ein Einfluss der Tagesperiodik zu erkennen.

Abbildung 23 zeigt den respiratorischen Quotienten (RQ) des Tieres über den Zeitraum von drei Tagen. Der RQ bewegt sich häufig zwischen 0,8 und 1,0. Innerhalb der Lichtphase ist jeweils eine Absenkung unter 0,7 zu erkennen. Im Verlauf des Morgens des 12.03. steigt der RQ auf Werte über 1,0 an, um dann mit Beginn der Ruhephase wieder abzufallen. Auffällig ist der starke Anstieg des RQ kurz vor Beginn der Lichtphase am 13.03, hier werden Werte bis 1,3 gemessen. Unmittelbar mit Einschalten des Lichts sinken die Werte wieder ab. Der ultradiane Rhythmus ist auch hier zu erkennen.

### 3.1.5 Herzfrequenz

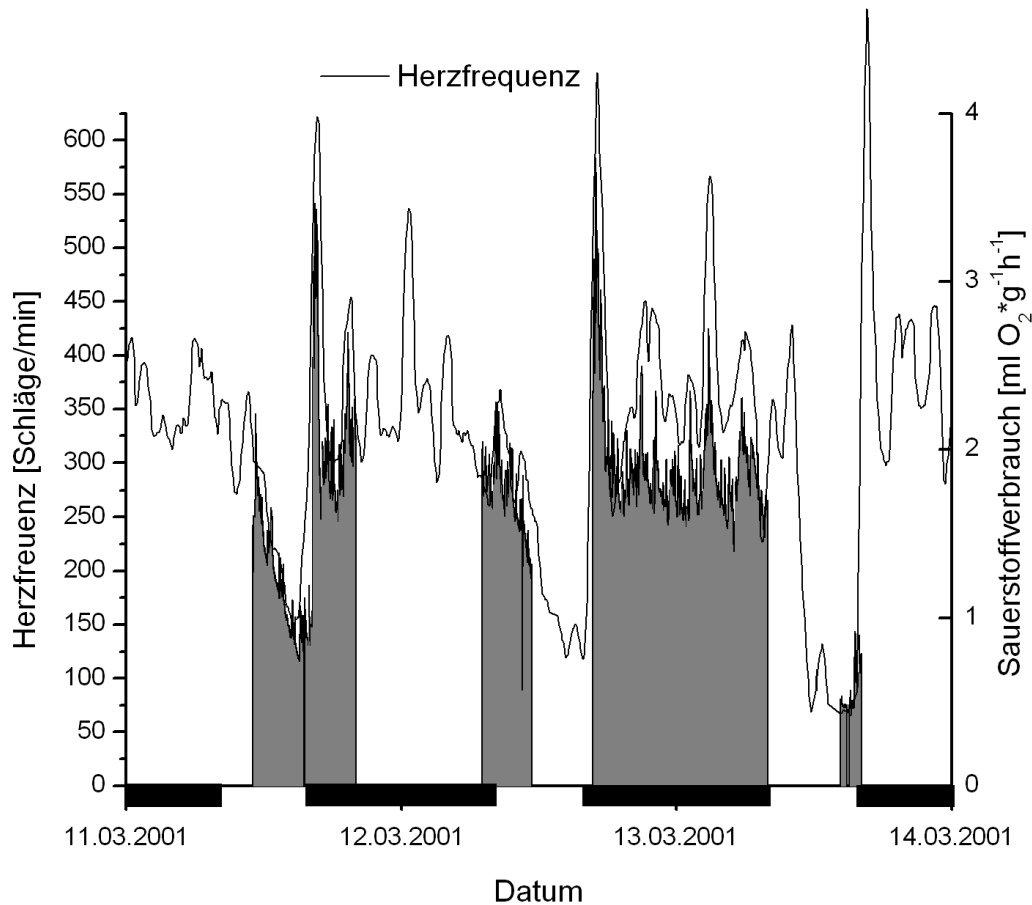


Abbildung 24: Verlauf der Herzfrequenz eines Zwerghamsters unter Kurztagbedingungen L:D 8:16. Die schwarzen Balken symbolisieren Dunkelheit. Die Herzfrequenz konnte nicht kontinuierlich aufgezeichnet werden. Um die Herzfrequenz mit dem Verhalten des Tieres vergleichen zu können, wurde der Sauerstoffverbrauch mit dargestellt.

Abbildung 24 zeigt in Fragmenten die Herzfrequenz des Tieres über den beschriebenen Zeitraum. Um die Herzfrequenz mit den andern Parametern in einen Kontext bringen zu können, wurde der Sauerstoffverbrauch im Hintergrund mit dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass der Verlauf der beiden Kurven im Wesentlichen identisch ist. Auffällig ist die starke Dynamik. Der Puls fällt während der Lichtphase auf Werte bis 70 Schläge pro Minute (BpM), um gleich anschließend zu Beginn der Aktivitätsphase Maximalwerte von 560 BpM zu erreichen. Während der restlichen Aktivitätsphasen pendelt sich die Herzfrequenz zwischen 250 und 300 Schlägen pro Minute ein. Es sind hierbei auch Phasen mit höherem und niedrigerem Puls zu erkennen. Deutlich ist auch der lineare Abfall der Frequenz in der Ruhephase des 11.03. und 12.03. wie er im Sauerstoffverbrauch deutlich wurde.

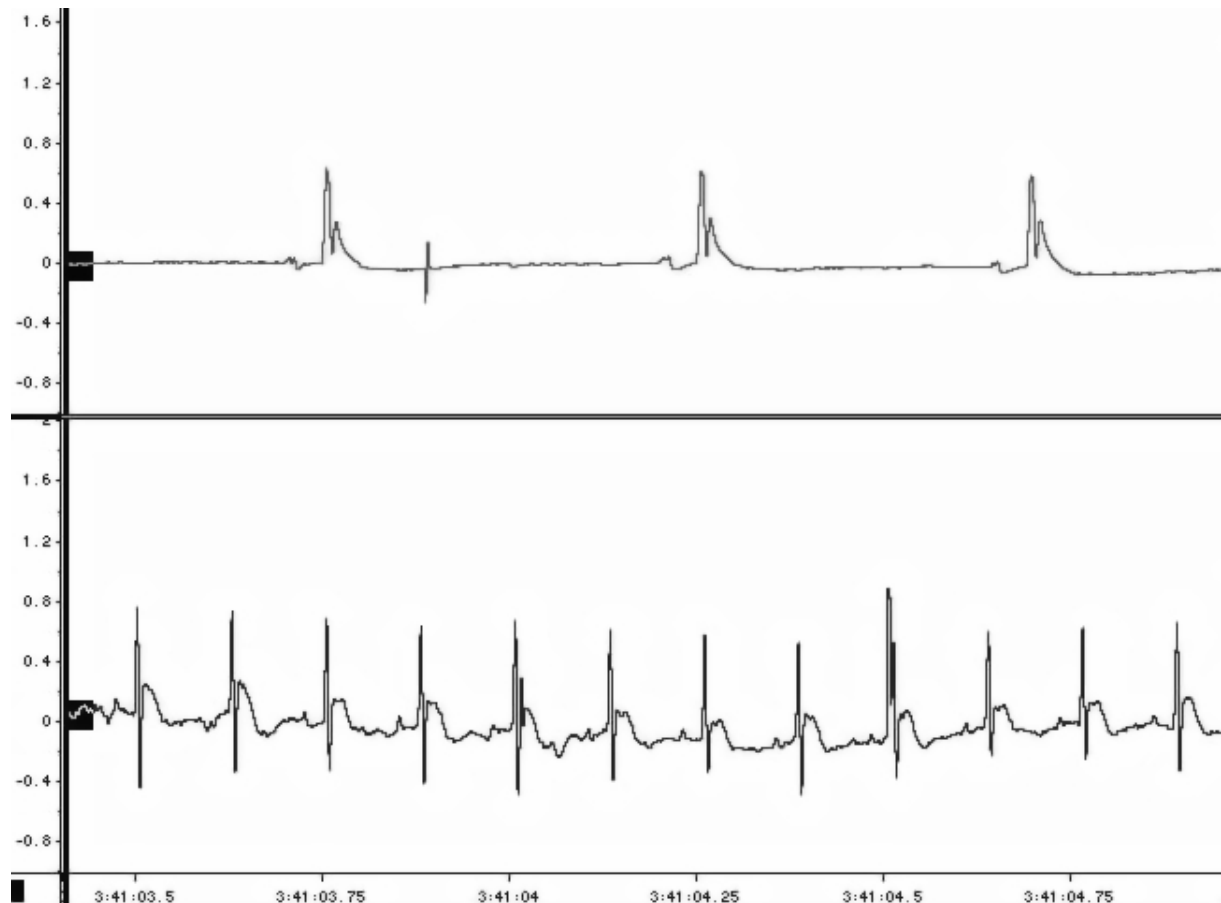


Abbildung 25: Signal des Herzfrequenzsenders. Der obere Plot zeigt die Ableitung des Herzmuskelpotenzials eines torpiden Hamsters mit einem Puls von 120 BpM, der untere ein normothermes Tier mit Puls 500 BpM. Die dargestellte Zeitspanne beträgt 1,5 Sekunden.

Abbildung 25 zeigt das empfangene Signal der Herzfrequenzsender. Der obere Plot stammt von einem torpiden Tier mit einem Puls von 120 BpM, der untere von einem aktiven, normothermen Tier mit einer Herzfrequenz von 500 BpM. Auf beiden Darstellungen sind die einzelnen Phasen der Herzrätigkeit gut zu unterscheiden. Beide EKGs stammen von einer Ein-Kanal Ableitung, aufgrund von zwei verlegten Elektroden. Das Fehlen der Q und S-Zacke im negativen Bereich im oberen Plot ist kein Effekt des Torpors, sondern durch die Lage der Elektroden bedingt. Bei dem hochfrequenten Ausschlag nach dem ersten PQRST Komplex des torpiden Hamsters handelt es sich um eine Störung, z.B. ein anderweitiges Muskelpotenzial, wie es häufiger zu beobachten war. Auffällig ist, dass durch den Torpor keine starke negative dromotrope Wirkung ausgeht, wie eine Betrachtung der P-Q Strecke zeigte, sondern hauptsächlich die Frequenz der Abfolge der Herzschlätze verlangsamt ist. Die leichte S-T Hebung des normothermen Tieres könnte auf eine eventuelle Ischämie hindeuten.

## 3.2 Mäuse

In diesem Teil der Ergebnisse werden die Beobachtungen an drei Gruppen von Mäusen (*Mus musculus*) über einen Zeitraum von 290 Tagen gezeigt. Es kamen jeweils acht Tiere der Genotypen Wildtyp, *mPer1* und *mPer2* defizient in den Versuch. Während des Versuchs ist jeweils ein Tier der Wildtypen und der *mPer2* defizienten gestorben. Es konnten keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Gesundheitszustand, Verhalten oder Habitus zwischen den Gruppen erkannt werden. Ebenso konnten keine augenscheinlichen Auswirkungen der verschiedenen Photoperioden auf die Tiere festgestellt werden.

Durch die Abfolge von Licht-Dunkel Wechsel und Dauerdunkel sollte überprüft werden, ob die Tiere auf den vorgegebenen Rhythmus synchronisiert waren. Dies war bei allen Tieren der Fall, bei denen sich vor und während des Freilaufs ein Rhythmus feststellen lies.

### 3.2.1 Aktivitätsmenge

Die Menge der Aktivität wurde als Mittelwert der Anzahl Bewegungsimpulse pro Tag (24 h) mit der Standardabweichung dargestellt. Abbildung 26 zeigt den Verlauf der Summe der Bewegungsaktivität über den getesteten Bereich bei den verschiedenen Genotypen. Die statistische Auswertung ergab für die *mPer1* defizienten Tiere signifikant niedrigere Aktivitätsmengen in den extremen Bereichen von 19 h bzw. 30 h im Vergleich zu den Werten um 24 h. Auch die Aktivität bei 22,5 h war bereits signifikant niedriger als bei 24 h. Ebenso waren die Werte unter Konstantbedingungen signifikant verschieden (siehe Abbildung 27). Diese Befunde entsprechen dem optischen Eindruck, dass die Aktivitätsmengen bei diesen Tieren um 24 h am höchsten sind.

Bei den *mPer2* defizienten Mäusen ergab die statistische Auswertung ein ähnliches, noch deutlicheres Bild. Hier unterscheiden sich ebenfalls die Aktivitätsmengen der extrem langen und kurzen Periodenlängen signifikant ( $P < 0.0001$ ) von den Werten um 24 h. Es findet sich kein Unterschied von 21 h bis 26 h, ebenfalls unterscheiden sich die Mittel der Aktivitätsmengen unter Konstantbedingungen nicht signifikant (siehe Abbildung 27).

Bei den Wildtypen bringt die Auswertung dagegen ein konträres Ergebnis. Hier findet sich nur in der Aktivitätsmenge zwischen 24 h und 30 h ein signifikanter Unterschied, ebenso unter Konstantbedingungen. Dieses Ergebnis bestätigt den augenscheinlichen Eindruck, dass die Aktivitätsmenge bei den Wildtypen wesentlich weniger variiert.

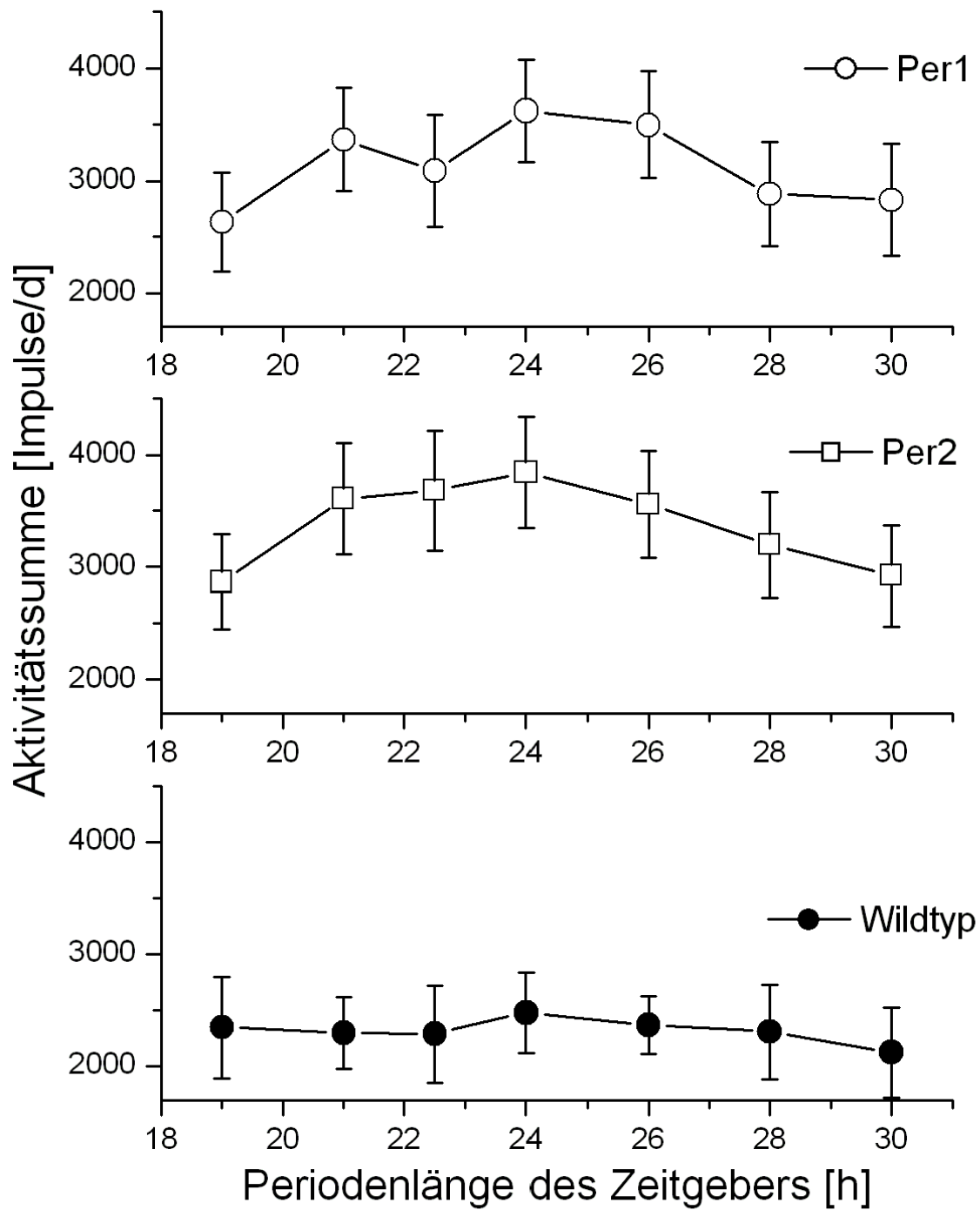


Abbildung 26: Summe der Aktivität pro Tag (24 h) der Genotypen unter den verschiedenen Periodenlängen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.



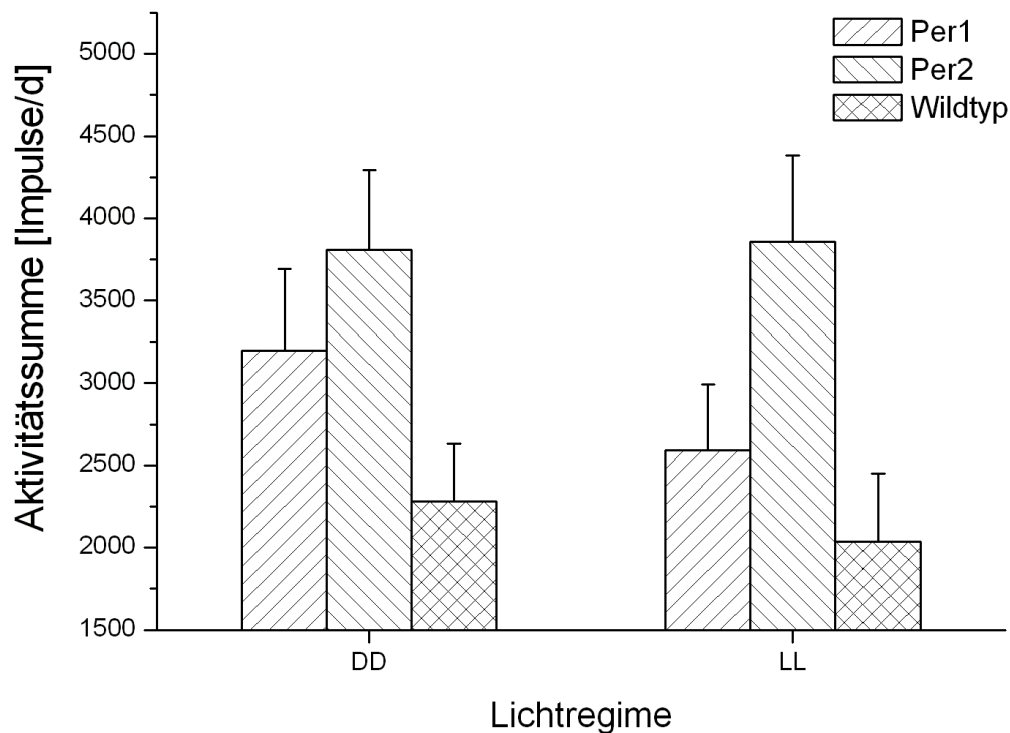


Abbildung 27: Aktivitätssummen der verschiedenen Genotypen unter konstanten Lichtbedingungen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Ein Vergleich der verschiedenen Genotypen unter Konstantbedingungen ist in Abbildung 27 dargestellt. Unter Konstantbedingungen unterscheiden sich alle Genotypen im Mittel signifikant voneinander ( $P < 0,0001$ ). Dies gilt sowohl für Dauerdunkel (DD) als auch für Dauerlicht (LL). Die Aktivitätsmenge unter Dauerdunkel ist bei den *mPer1* und Wildtyp Tieren höher als im Dauerlicht.

Bei der Betrachtung der Aktivitätsmengen in Abbildung 26 fällt der Unterschied zwischen Wildtypen und *mPer* defizienten Tieren besonders im Bereich von 22,5 h bis 26 h auf. Hier zeigen die Wildtypen nicht die Erhöhung in der Aktivitätsmenge, die bei den andern beiden Gruppen zu erkennen ist. Die Statistik bestätigt den Augenschein. Im Bereich von 19 h bis 26 h ist die Aktivitätsmenge der Wildtypen signifikant geringer als die der Vergleichsgruppen. Diese hingegen sind in dem genannten Bereich nicht zu unterscheiden. Bei Periodenlängen von 28 h und 30 h zeigen die Wildtypen noch signifikant weniger Aktivität als die *mPer1* Tiere.

Als Fazit der Betrachtung der Aktivitätsmengen lässt sich feststellen: Die Aktivität der *mPer* defizienten Tiere ist im Bereich um 24 h deutlich höher als die der Wildtypen, die über den

gesamten Bereich weitgehend konstant niedrig bleibt. Dieser Trend setzt sich auch unter Konstantbedingungen fort. Die Wildtypen sind am wenigsten aktiv während die *mPer2* Mäuse die höchste Aktivität zeigen, unabhängig von den Lichtbedingungen.

### 3.2.2 Mitnahmebereich

Der Mitnahmebereich ist die Spanne in der Periodenlänge eines externen Zeitgebers, der ein Tier noch folgen kann. Wie weit die verschiedenen Gruppen zu synchronisieren waren, wurde anhand der gemessenen Periodenlängen ( $\tau$ ) der Tiere bestimmt. Hatte eine Maus ein  $\tau$  von 21 h bei einem ebensolchen Lichtregime, so war sie damit synchronisiert. Diese Ergebnisse wurden durch die Betrachtung des Aktogramms im anschließenden Dauerdunkel bestätigt (siehe 2.5.2 Synchronisation).

In Abbildung 28 ist der Mitnahmebereich der verschiedenen Genotypen dargestellt. Bei Betrachtung der Graphen für die beiden *mPer* Gruppen fällt der nahezu lineare Verlauf auf. Die Statistik bestätigt den Eindruck, die Mittelwerte aller  $\tau$  unterscheiden sich bei diesen Tieren signifikant ( $P < 0,0001$ ). Die Regressionsgleichung der linearen Anpassung an die Werte lautet wie folgt:

$$\begin{array}{ll} mPer1 : f(x) = 0,827 + 0,965x & R^2 = 0,991 \\ mPer2 : f(x) = 0,153 + 0,992x & R^2 = 0,964 \\ Wildtyp: f(x) = 9,888 + 0,604x & R^2 = 0,650 \end{array}$$

Bereits bei der Regressionsgleichung der Wildtypen fallen diese auf. Der Kurvenverlauf ist ebenso deutlich verschieden und zeigt eine Abflachung in den äußeren Bereichen bei den extremen Werten. Die Statistik bestätigt dies. Die Mittelwerte der Wildtypen sind bei 19 h und 21 h sowie bei 28 h und 30 h nicht voneinander zu unterscheiden. Die Datenpunkte in den anderen Bereichen unterscheiden sich dagegen deutlich. Dies führt bei dieser Gruppe zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf.

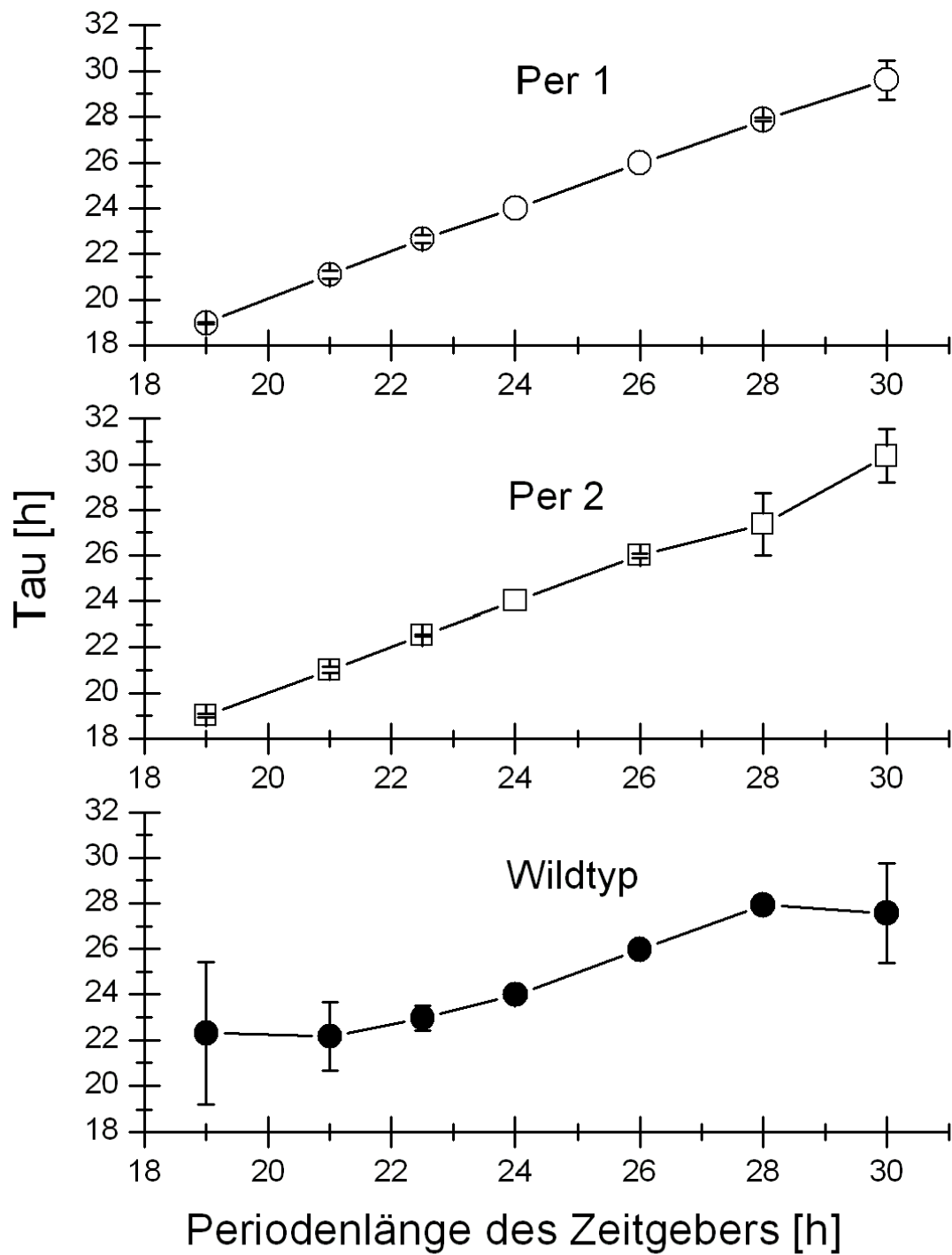


Abbildung 28: Mitnahmebereich der verschiedenen Genotypen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung des gemessenen  $\tau$  bei den entsprechenden Periodenlängen des Zeitgebers.

Ein Vergleich der Genotypen untereinander verdeutlicht die Unterschiede zwischen den Wildtypen und den *mPer* defizienten Tieren. Die Varianzanalyse über die drei Genotypen zu den jeweiligen Periodenlängen des externen Zeitgebers findet signifikante Unterschiede. Die Wildtypen lassen sich bei 19 h und 21 h klar unterscheiden, ebenso bei 30 h. Bei 22,5 h sind sie noch von den *mPer2* Tieren abzugrenzen.

Die *mPer* Tiere lassen sich statistisch zu keinem Zeitpunkt voneinander unterscheiden. Bei allen getesteten Periodenlängen synchronisieren diese Gruppen praktisch vollständig mit dem Zeitgeber. Die resultierenden, linearen Regressionsgeraden haben eine Steigung von annähernd eins ebenso wie die Fehlerquadrate ( $R^2$ ).

Als Fazit lässt sich zum Mitnahmebereich festhalten, dass die *mPer* defizienten Tiere über den gesamten getesteten Verlauf dem externen Zeitgeber folgen konnten. Die Regressionsgeraden haben eine Steigung von annähernd eins bei einer nur geringen Streuung. Die Wildtypen dagegen folgen nur Periodenlängen zwischen 22,5 h und 28 h.

### 3.2.3 Rhythmusstabilität unter Licht-Dunkel Wechsel

Neben der Frage, ob die Tiere einem externen Rhythmus folgen können, interessiert auch wie gut sie das können. Daher wurde die Rhythmusstabilität (siehe 2.5.3 Rhythmusstabilität) für die einzelnen Gruppen unter den verschiedenen Bedingungen berechnet. Abbildung 29 zeigt den Parameter nach Tiergruppen aufgeteilt und gegen die Periodenlänge des Zeitgebers angetragen.

Die statistische Auswertung erfolgte wiederum mit einer Varianzanalyse und anschließendem Post Hoc Test. Bei den *mPer1* Mäusen unterscheiden sich wieder die extremen Werte bei 19 h und 30 h signifikant von den höheren Mitteln um 24 h. Auffällig ist eine Rechtsverschiebung der Kurve. So ist das Mittel bei 22,5 h signifikant niedriger als das bei 26 h. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass die niedrigen Datenpunkte zwischen 19 h und 22,5 h sich nicht untereinander trennen lassen aber alle signifikant unterschiedlich von 24 h bis 28 h sind.

Das Bild der *mPer2* Tiere unterscheidet sich von dem der *mPer1* Mäuse. Zwar sind auch hier die Extremwerte signifikant niedriger als die Mittel von 22,5 h bis 26 h, die sich statistisch nicht unterscheiden lassen. Die Werte von 19 h, 21 h, 28 h und 30 h sind aber nicht zu trennen, obwohl die Datenpunkte bei den kürzeren Perioden höhere Werte suggerieren. Eine Verschiebung wie bei der ersten Gruppe lässt sich nicht zeigen. Den Kurvenverlauf der *mPer2* Tiere findet man in ähnlicher Weise auch bei den Wildtypen, hier ist die Symmetrie

offensichtlich. Allerdings zählt der Datenpunkt bei 22,5 h hier zu den signifikant niederen Werten.

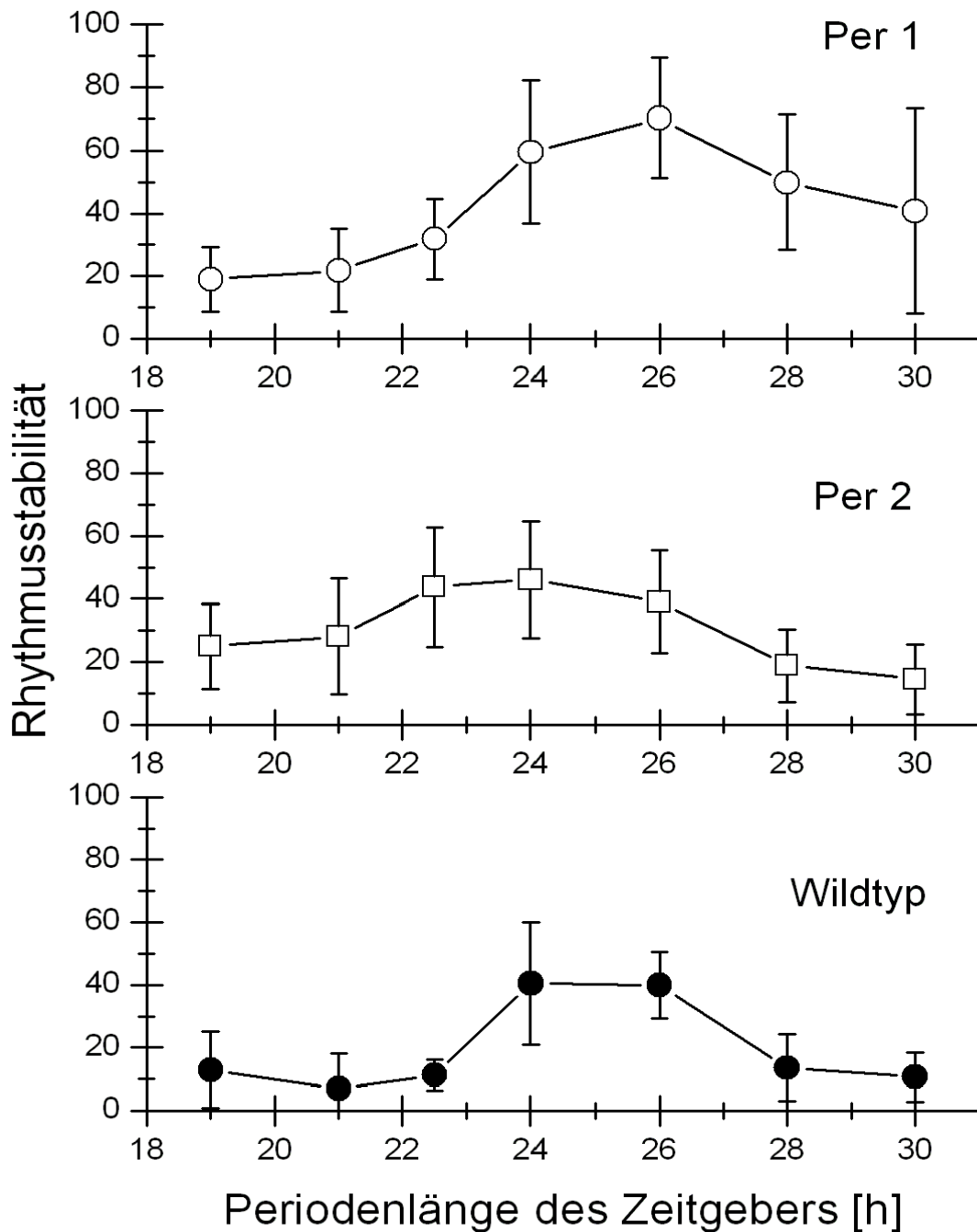


Abbildung 29: Rhythmusstabilität der verschiedenen Gruppen bei den getesteten Periodenlängen des Zeitgebers. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Rhythmusstabilität

Der Vergleich der Gruppen bezüglich der Rhythmusstabilität wurde ebenfalls mittels Varianzanalyse angestellt. Die Wildtypen weisen eine im Vergleich signifikant schlechtere Rhythmusstabilität bei 21 h, 22,5 h und 28 h auf. Die *mPer1* Mäuse bleiben bei 24 h und 26 h besser im Takt. Sie unterscheiden sich allerdings nicht bei 28 h und 30 h wie es den Anschein hat.

Als Fazit lässt sich feststellen, dass bei den *mPer1* Mäusen eine Rechtsverschiebung zu finden ist. Diese Gruppe kann längeren Perioden besser folgen. Die *mPer2* Tiere zeigen eine Tendenz, den kürzeren Periodenlängen besser folgen zu können, was sich aber nicht beweisen lässt. Die Wildtypen zeigen in den extremen Periodenlängen einen schlechteren Rhythmus als bei 24 h, sind aber auch hier nicht besser als die *mPer* Tiere.

### 3.2.4 After Effects

Auswirkungen der vorausgegangenen Photoperiode bezeichnet man als After Effects. Um diese zu untersuchen, wurden die unter 3.2.3 „Rhythmusstabilität unter Licht-Dunkel Wechsel“ beschriebenen Tests hier im Dauerdunkel an den Tieren durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zu den vorausgegangenen Periodenlängen des externen Zeitgebers in Beziehung gebracht. Auf eine Betrachtung der After Effects einer 30 h Periode konnte hier nicht eingegangen werden, da die Versuche noch nicht beendet waren.

#### 3.2.4.1 Auswirkungen auf die Periodenlänge

Abbildung 30 zeigt das im Freilauf ermittelte  $\tau$  der Tiere in Abhängigkeit von der Periodenlänge des vorausgegangenen Lichtregimes. Die statistische Auswertung erfolgte wiederum über eine Varianzanalyse mit Post Hoc Test. Bei den *mPer1* defizienten Tieren zeigt sich eine leichte Verlängerung des  $\tau$  bei größeren Periodenlängen des vorausgegangenen externen Zeitgebers. Der Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen 19 h und 30 h. Damit bestätigt sich der Eindruck. Die Funktionsgleichung der linearen Regression lautet:

$$mPer1: \quad f(x) = 21,81 + 0,09x \quad R^2 = 0,306$$

Der Graph der *mPer2* Tiere unterscheidet sich deutlich von den andern Gruppen. Er ist kürzer und steiler. Diese Tiere waren nach den extremen Periodenlängen alle arhythmisch geworden, weshalb hier kein  $\tau$  berechnet werden konnte. Der Datenpunkt bei 28 h wird nur von einem Tier gebildet und darum nicht berücksichtigt. Es gingen somit nur die Datenpunkte von 21 h

bis 26 h ein. Die Statistik ergibt eine signifikante Steigerung des  $\tau$  mit steigender vorausgegangener Periodenlänge. Die Funktionsgleichung der linearen Regression lautet:

$$mPer2: \quad f(x) = 9,91 + 0,58x \quad R^2 = 0,532$$

Das Bild bei den Wildtypen erscheint ohne Steigung, eine höhere Auflösung zeigt aber auch hier eine Verlängerung des  $\tau$  mit zunehmender externer Periodenlänge. Lediglich der Wert bei 22,5 h stellt einen Ausreißer nach unten dar. Die Statistik bestätigt die Steigung, die äußeren Werte zwischen 19 h und 21 h lassen sich von den 26 und 28 h Werten trennen. Die lineare Regression für die Wildtypen lautet:

$$\text{Wildtyp:} \quad f(x) = 22,75 + 0,05x \quad R^2 = 0,255$$

Bei einem Vergleich der gemessenen  $\tau$  der Gruppen abhängig vom vorausgegangen Lichtregime zeigt die Statistik signifikant niedrigere Werte der *mPer2* Tiere bei 21 h und 22,5 h. An dieser Graphik wird das Fazit deutlich. Die Wildtypen und *mPer1* Mäuse zeigen zwar messbare aber nur sehr geringe Auswirkung des vorausgegangenen Lichtregimes über gesamten getesteten Bereich. Die *mPer2* Tiere dagegen reagieren deutlich auf die Vorbedingungen. Bei den extremen Werten werden sie arhythmisch, in den zentralen Bereichen spiegeln sich die Vorbedingungen deutlich wieder. In Abbildung 31 ist dies anhand des Aktogramms einer *mPer2* defizienten Maus dargestellt. Zu sehen ist der Übergang von dem Lichtregime zum Dauerdunkel. Das Tier weist keinen Unterschied in seinem Aktivitätsmuster auf. Ebenso ist die Rhythmusstabilität nach dieser Periodenlänge auch im Dauerdunkel sehr hoch (siehe 3.2.4.2 Auswirkungen auf die Rhythmusstabilität). Abbildung 3 auf Seite 12 zeigt im Vergleich dazu das Aktogramm eines *mPer1* Tieres, das nach Beendigung des L:D 11,25:11,25 Lichtregimes im Dauerdunkel ein verändertes  $\tau$  zeigt.

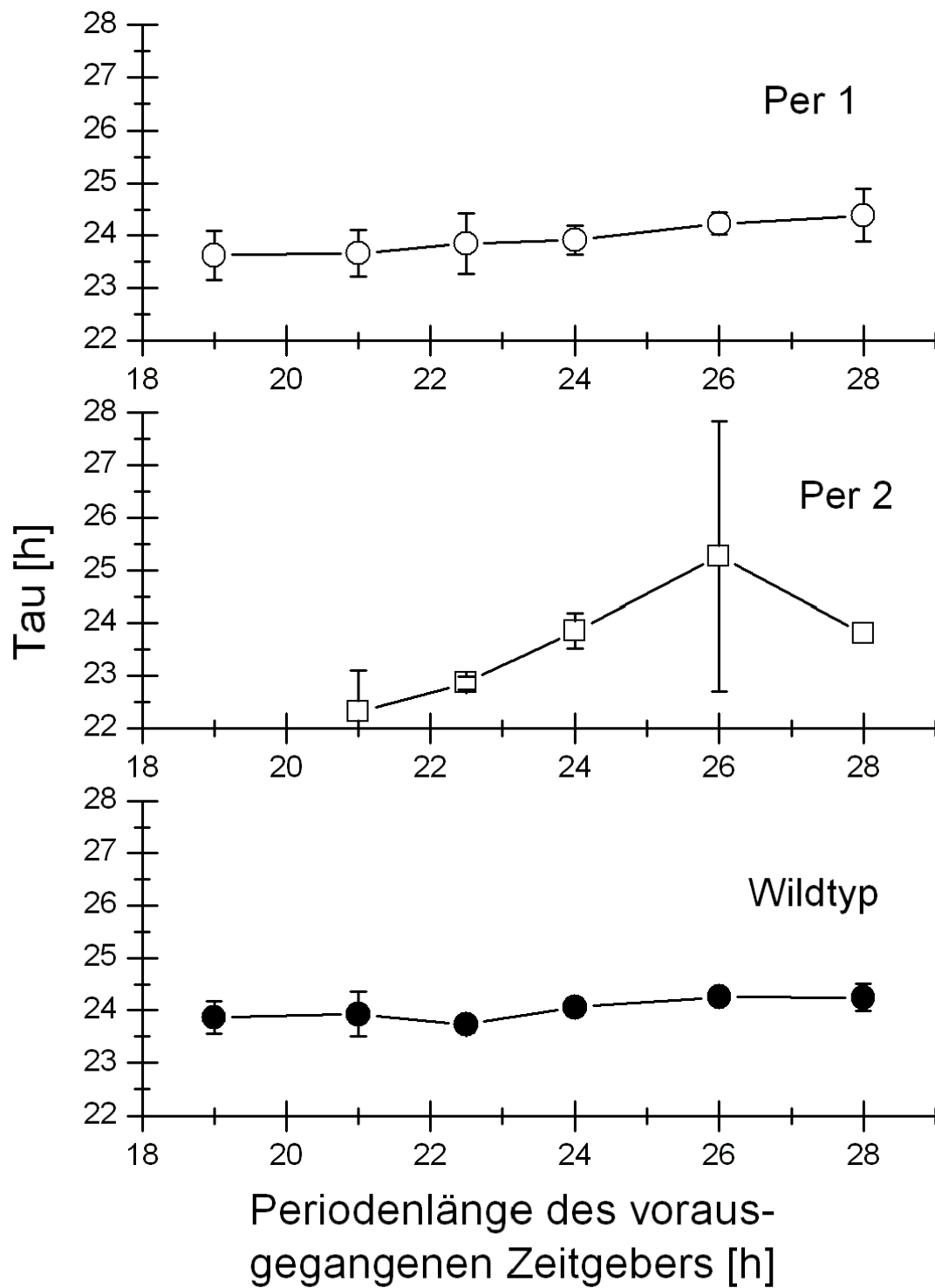


Abbildung 30: Dargestellt ist die gemessene Periodenlänge ( $\tau$ ) der im Dauerdunkel (Freilauf) gehaltenen Tiere. Das  $\tau$  ist gegen die vorausgegangene Periodenlänge des Zeitgebers angetragen um die After Effects zu zeigen.



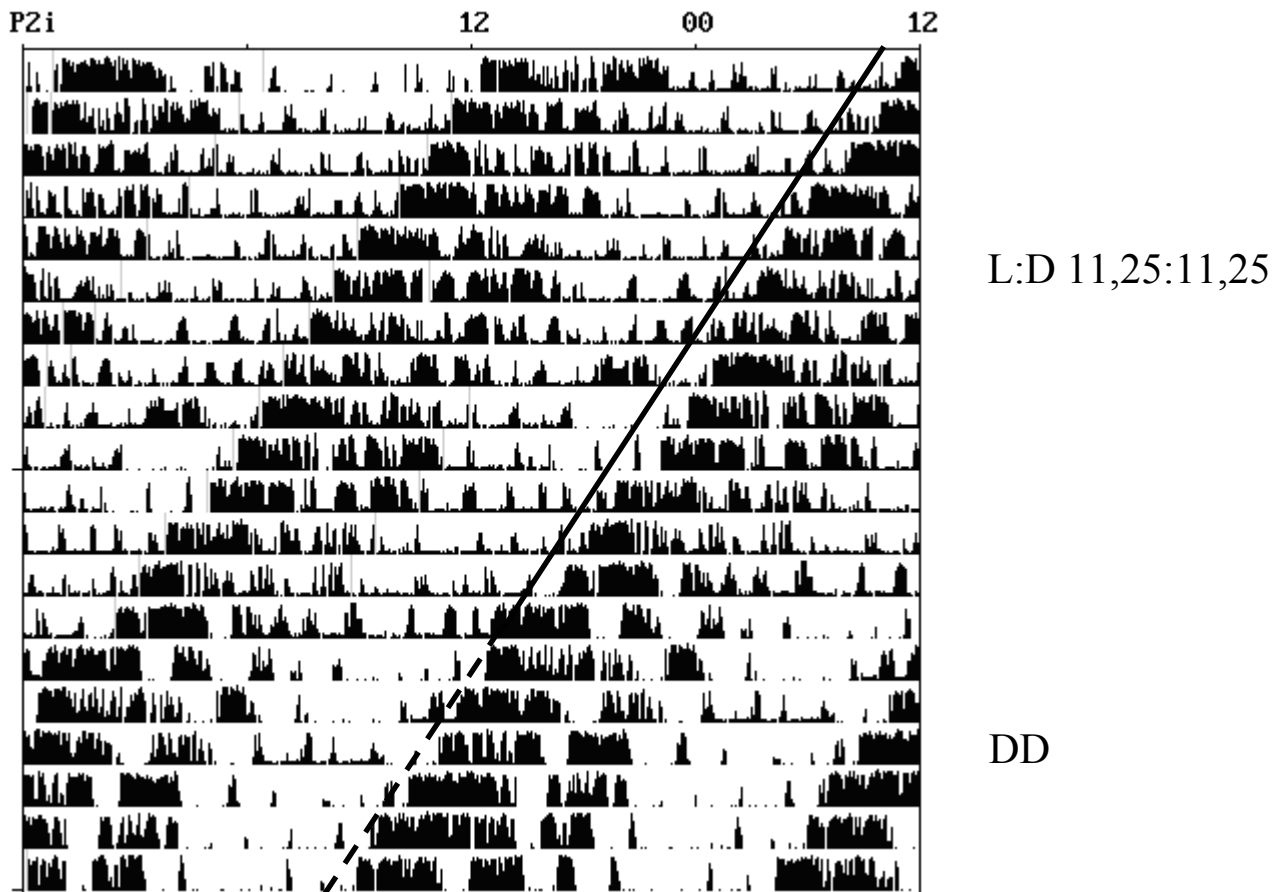


Abbildung 31: Aktogramm einer *mPer2* defizienten Maus beim Übergang von L:D 11,25:11,25 zu Dauerdunkel. Der schwarze durchgehende Strich symbolisiert den Licht-Dunkel Wechsel, die unterbrochene Linie das Dauerdunkel. Das Tier zeigt im Freilauf dieselbe Periodenlänge. Im Vergleich zeigt Abbildung 3 auf Seite 12 ein Tier mit verändertem  $\tau$  im Freilauf.

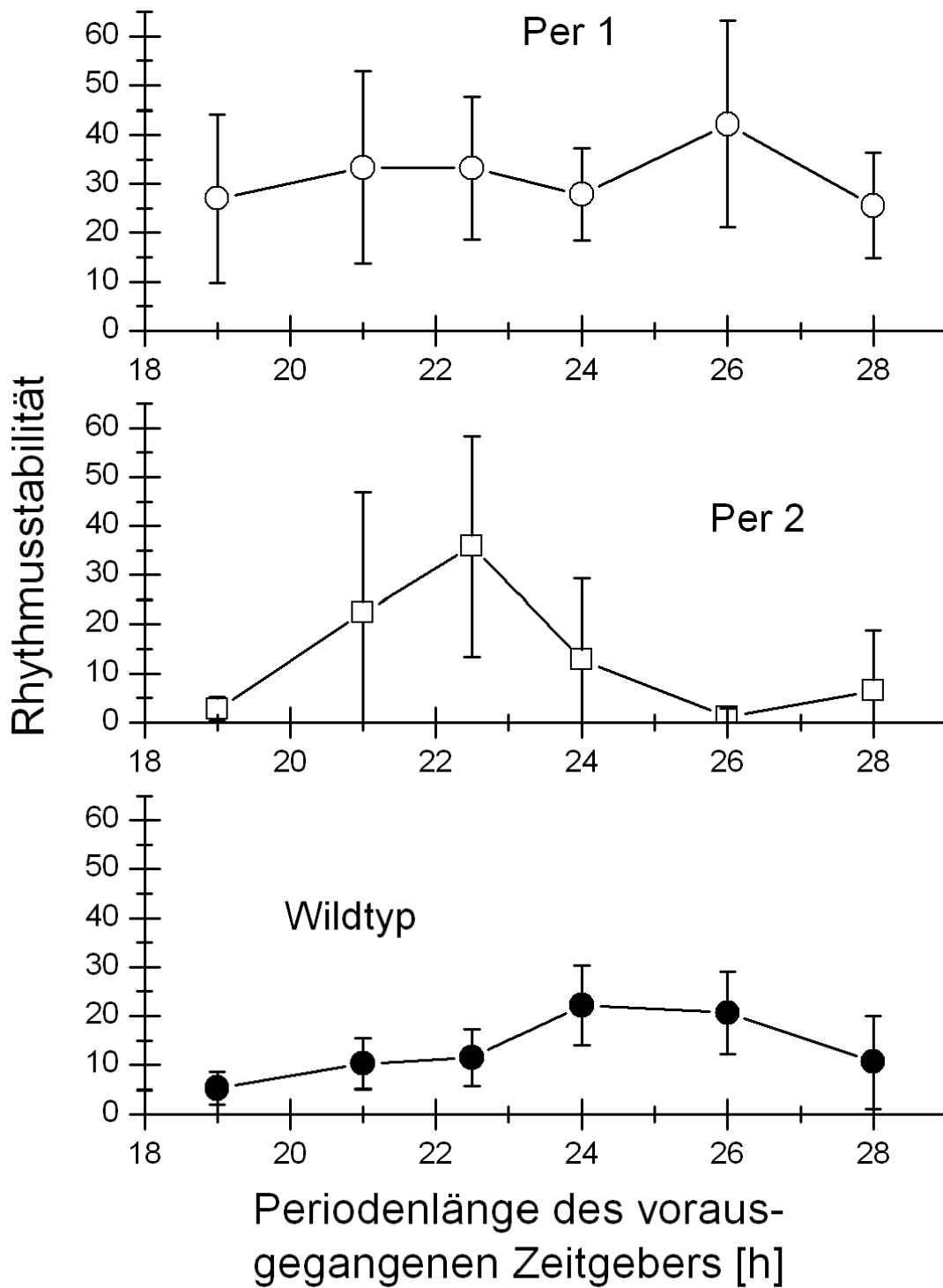


Abbildung 32: Rhythmusstabilität der Mäuse im Freilauf unter Dauerdunkel angetragen gegen die Periodenlänge des vorausgegangenen Lichtregimes.

### 3.2.4.2 Auswirkungen auf die Rhythmusstabilität

Neben den Auswirkungen des vorausgegangenen Lichtregimes auf das zu messende  $\tau$  der Tiere in Freilauf wird auch die Rhythmusstabilität unter Dauerdunkelbedingungen abhängig von der Vorgeschichte der Tiere betrachtet. Abbildung 32 zeigt den Verlauf der Rhythmusstabilität der einzelnen Gruppen im Freilauf angetragen gegen das ursprüngliche Lichtregime. Die Statistik findet für die einzelnen Werte der *mPer1* Tiere keinen signifikanten Unterschied. Anders ist es bei den *mPer2* Mäusen. Hier steigen die Mittel von 19 h bis 22,5 h signifikant an, um dann wiederum signifikant bis 26 h abzufallen. Der Wert bei 22,5 h stellt hier das Maximum dar. Die Wildtypen schließlich zeigen eine signifikant steigende Rhythmusstabilität von 19 h bis 24 h, und einen signifikanten Abfall von 26 h bis 28 h.

Der Vergleich der drei Gruppen untereinander zeigt eine konstant hohe Rhythmusstabilität im Dauerdunkel bei den *mPer1* Tieren. Diese ist bei 19 h, 26 h und 28 h signifikant höher als bei den Vergleichsgruppen. Die *mPer2* Mäuse erreichen das Niveau der *mPer1* Gruppe nur bei 22,5 h. Ansonsten zeigen diese Tiere eine sehr geringe Rhythmusstabilität im Dauerdunkel, die bei 26 h signifikant unter den Vergleichsgruppen liegt und zu den anderen gemessenen Periodenlängen null ist. Die Wildtypen weisen keine höhere Rhythmusstabilität auf als die *Per* defizienten Tiere. Bei 22,5 h liegt sie sogar signifikant darunter, bei 26 h lässt sie sich zwar von den Vergleichsgruppen unterscheiden, liegt aber weiterhin unter der *mPer1* Gruppe. Als Fazit lässt sich festhalten, dass im Dauerdunkel die *mPer1* Tiere eine konstant hohe Rhythmusstabilität haben. Die *mPer2* Mäuse haben ein eng begrenztes Maximum bei 22,5 h während die Wildtypen eine moderate Rhythmusstabilität zeigen. Sie liegt bei 24 h und 26 h am höchsten und fällt zu den Extremen ab.

### 3.2.5 Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch ist ein direktes Maß für die umgesetzte Energiemenge (siehe 2.7.1 Berechnung des Energieumsatzes mittels der indirekten Kalorimetrie). Um den Einfluss der Periodenlänge des externen Zeitgebers auf den Energieumsatz der Tiere zu ermitteln, wurde der Sauerstoffverbrauch kontinuierlich über mindestens zwei Tage aufgenommen. Als Maß für den Energieumsatz wird hier der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch pro Gramm Körpergewicht und Stunde verwendet.

### 3.2.5.1 Einfluss der Periodenlänge

Abbildung 33 zeigt den durchschnittlichen Sauerstoffverbrauch der verschiedenen Genotypen unter den variierenden Periodenlängen des externen Zeitgebers. Die Statistik zeigt bei den *mPer1* Mäusen einen signifikanten Anstieg des Sauerstoffverbrauchs von 19 h bis 24 h. Diesem steht ein ebenso signifikanter Abfall des Sauerstoffverbrauchs von 24 h bis 28 h gegenüber. Die Werte bei 28 h und 30 h lassen sich nicht unterscheiden. Die *mPer2* defizienten Tiere zeigen bei Periodenlängen über 24 h ebenfalls den signifikanten Abfall, wobei 28 h und 30 h wiederum nicht zu trennen sind. Bei den kürzeren Periodenlängen ist das Bild nicht so einheitlich. Der Sauerstoffverbrauch steigt auch hier von 19 h bis 24 h signifikant an, aber der Wert von 22,5 h liegt signifikant unter 21 h. Allerdings bildet dieser Wert bei 22,5 h nicht den niedrigsten Punkt der Graphik, die Mittel bei 19 h und 28 h sind signifikant niedriger. Die Wildtypen schließlich zeigen ebenfalls einen signifikanten Anstieg ihres Sauerstoffverbrauchs von 19 h bis 24 h. Auch hier fällt die Metabolismusrate wieder mit zunehmender Periodenlänge signifikant ab. Der Wert bei 26 h stellt einen Ausreißer nach unten dar. Er ist aber nicht von den ebenfalls niedrigen Stoffwechselraten bei 19 h und 21 h zu unterscheiden. Auffällig ist, dass die rechte Flanke der Kurve bei längeren Perioden nicht so steil abfällt wie die linke bei kurzen Perioden. Die Mittel bei 19 h und 21 h liegen signifikant unter dem von 30 h.

Der Vergleich des Sauerstoffverbrauchs der Genotypen untereinander bei den wechselnden Periodenlängen brachte folgendes Ergebnis: Bei 19 h lassen sich die nur *mPer1* und *mPer2* Tiere unterscheiden. Bei 21 h haben die *mPer2* Tiere einen signifikant höheren Stoffwechsel, während bei 22,5 h sich nur die Wildtypen von der *mPer1* Gruppe differenzieren. Bei 24 h haben nur die Wildtypen einen signifikant niedrigeren O<sub>2</sub> Verbrauch als die Vergleichsgruppen, bei 26 h dagegen lassen sich alle Gruppen trennen. Bei 28 h zeigen nun die *mPer2* Mäuse einen signifikant niedrigeren Metabolismus, während bei 30 h die Gruppe der *mPer1* Tiere einen signifikant höheren Stoffwechsel aufweist.

Als Fazit lässt sich feststellen, dass bei allen Gruppen die höchsten Stoffwechsel bei 24 h gemessen wurden. Zu den längeren und kürzeren Perioden hin nimmt der Stoffwechsel signifikant ab. Auffällig sind die „Ausreißer“ hin zu niedrigeren Werten bei *mPer2* bei 22,5 h und bei den Wildtypen bei 26 h. Ein einheitlich höherer oder niedrigerer Sauerstoffverbrauch kann bei keiner Gruppe nachgewiesen werden.

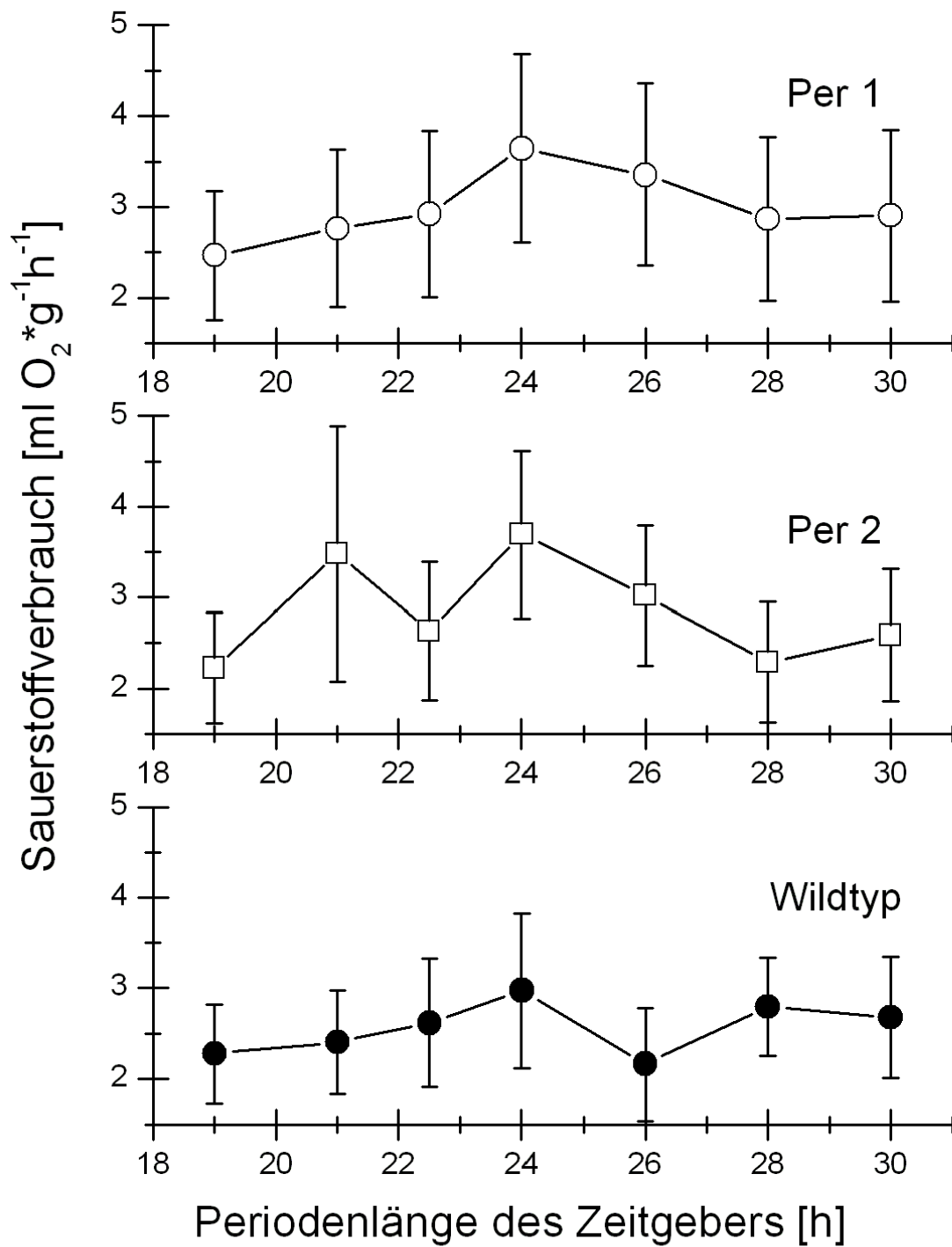


Abbildung 33: Mittlerer Sauerstoffverbrauch der Genotypen bei verschiedenen Periodenlängen des externen Zeitgebers. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

### 3.2.5.2 Abhängigkeit von $\tau$ im Freilauf

Die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von dem  $\tau$  der Tiere im Freilauf, also im Dauerdunkel oder Dauerlicht, wurde untersucht. Hierzu wurden die Mäuse nach einem L:D 12:12 Zyklus für 30 Tage im Dauerlicht gehalten. Die Dauerdunkelwerte sind aus allen gemessenen Episoden mit diesen Lichtbedingungen gemittelt. Es wurden nur die Daten der Tiere verwendet, die rhythmisch waren. Abbildung 34 zeigt eine Darstellung der Mittelwerte der jeweiligen Gruppen mit den entsprechenden Standardabweichungen. Alle drei Gruppen haben im Dauerlicht einen signifikant höheren Sauerstoffverbrauch als im Dauerdunkel. Im Vergleich der Gruppen untereinander lässt sich lediglich im Dauerdunkel bei den *mPer1* Defizienten ein signifikant höherer  $O_2$  Verbrauch nachweisen als bei den anderen Gruppen unter diesen Lichtbedingungen. Ein Vergleich der endogenen Periodenlängen ( $\tau$ ) der jeweiligen Genotypen bei den verschiedenen Lichtbedingungen zeigt ebenfalls nur für die *mPer1* Tiere einen signifikanten Unterschied. Im Dauerdunkel ist deren  $\tau$  kürzer. Bei den beiden anderen Gruppen lässt sich mit den gewonnenen Daten kein Unterschied finden. Ein Vergleich der Gruppen untereinander bezüglich ihres  $\tau$  zeigt im Dauerdunkel eine signifikante Verkürzung für die *mPer2* Mäuse. Unter Dauerlicht lassen sich alle Gruppen voneinander unterscheiden. Die *Per1* haben die längste Periode, gefolgt von den Wildtypen, die *Per2* Mäuse haben hier das kürzeste  $\tau$ .

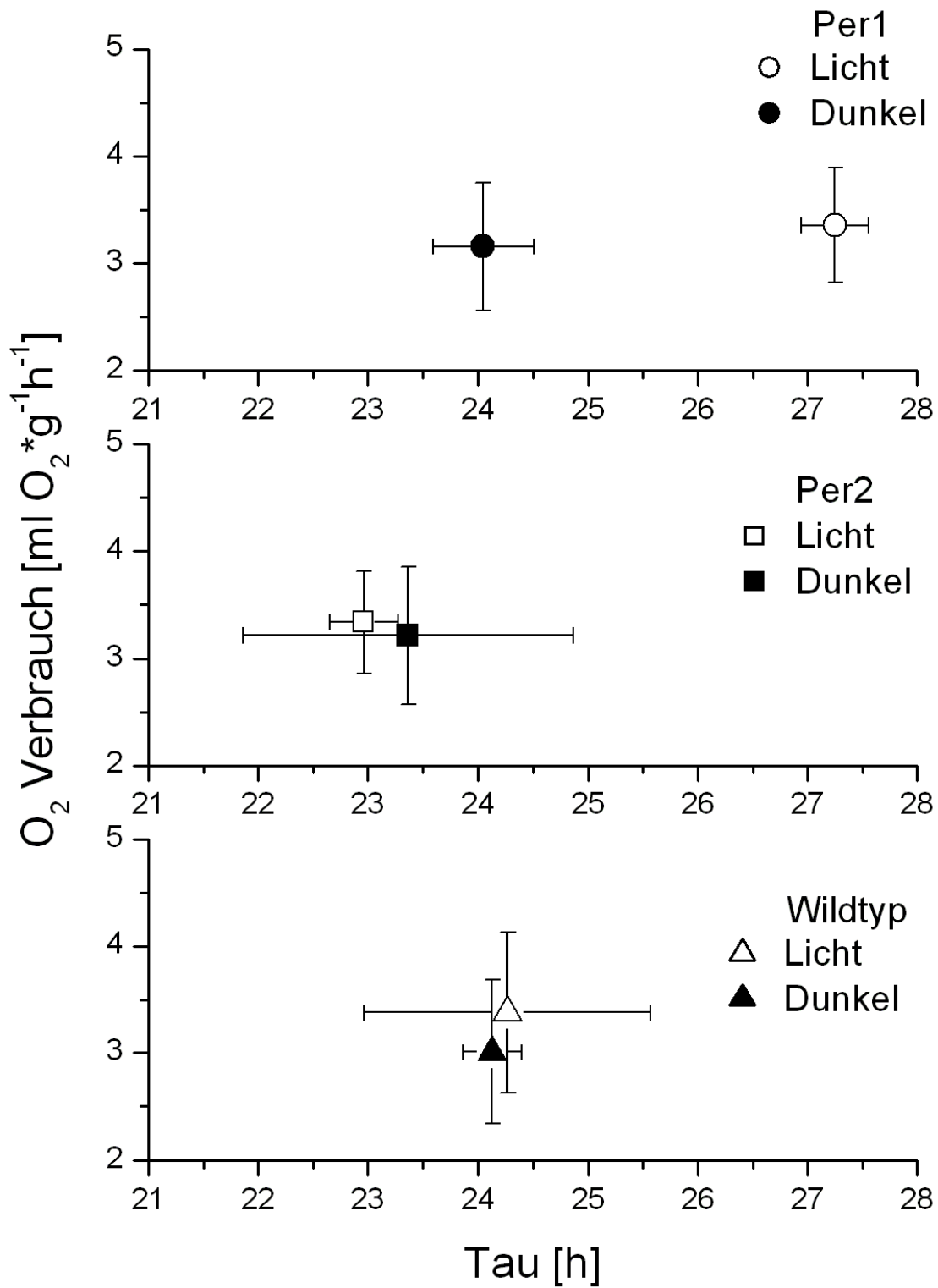


Abbildung 34: Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von dem  $\tau$  der Tiere im Freilauf. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung.

## 3.2.5.3 Einfluss der Rhythmusstabilität

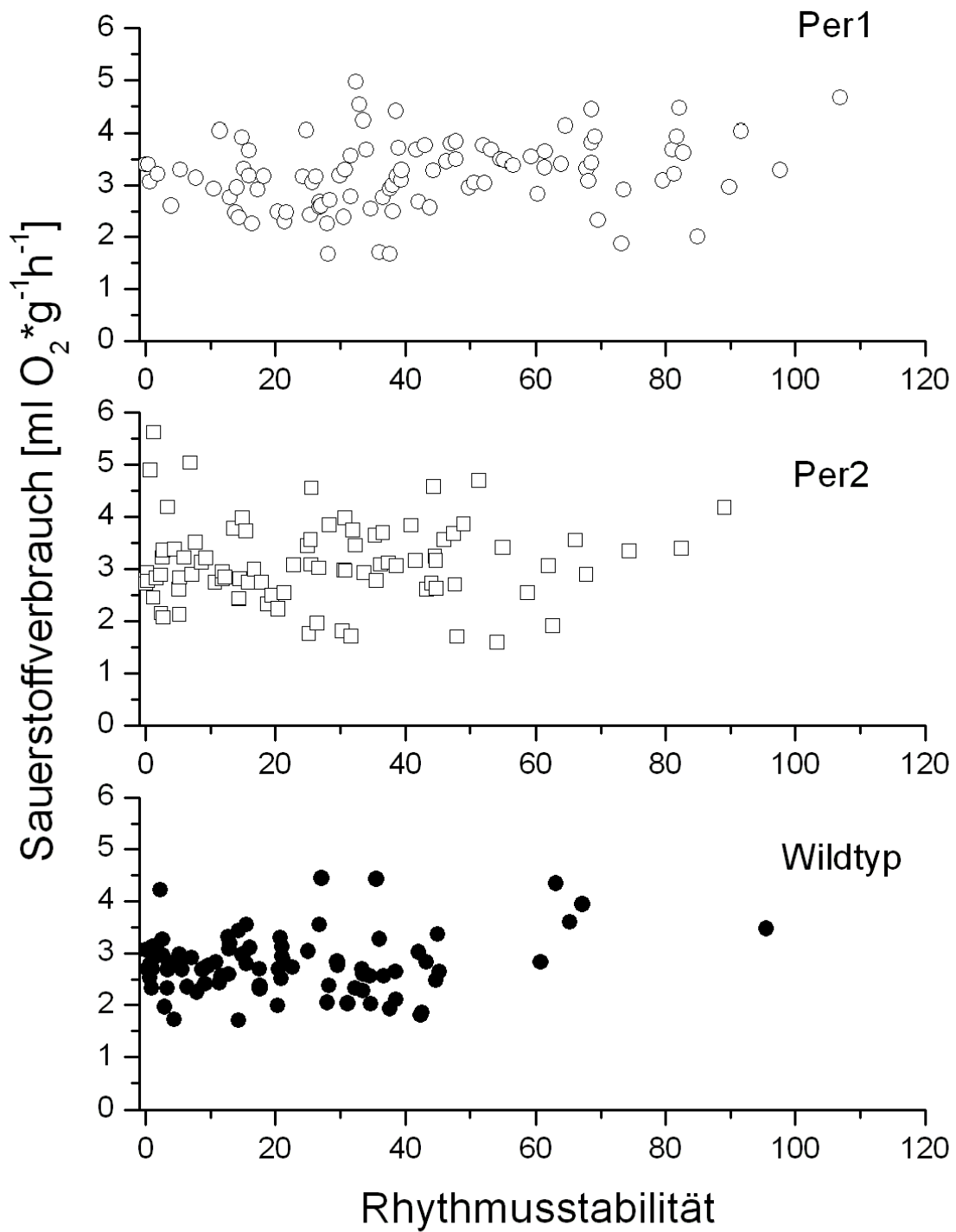


Abbildung 35: Vergleich der Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Rhythmusstabilität. Dargestellt sind Tagesmittelwerte von Einzeltieren.



Der Einfluss der Rhythmusstabilität der einzelnen Genotypen auf den Sauerstoffverbrauch, wie er in Abbildung 35 dargestellt ist, wurde mit einer Regressionsanalyse getestet. Ebenso wurden die Werte aller Tiere zusammen getestet. Tabelle 4 enthält die Ergebnisse.

Tabelle 4: Ergebnisse der Regressionsanalyse

Genotyp	F Wert	P Wert	R <sup>2</sup>	Funktionsgleichung
<i>mPer1</i>	6,85	0,0010	0,067	$f(x) = 2,907 + 0,007 x$
<i>mPer2</i>	0,13	0,7174	0,002	$f(x) = 3,057 + 0,001 x$
Wildtyp	2,75	0,1013	0,101	$f(x) = 2,670 + 0,006 x$
alle	13,79	0,0002	0,049	$f(x) = 2,837 + 0,007 x$

Als Fazit lässt sich festhalten, dass sich aus den vorhandenen Daten keine Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Rhythmusstabilität ableiten lässt. Ebenso unterscheiden sich die unterschiedlichen Genotypen nicht hinsichtlich dieses Kriteriums.

### 3.2.6 Respiratorischer Quotient

Der respiratorische Quotient, gebildet aus dem Quotienten von abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff, ist ein geeigneter Parameter, um den Metabolismus genauer zu betrachten. Der Einfluss der Periodenlänge des externen Zeitgebers auf den respiratorischen Quotienten wurde parallel zum Sauerstoffverbrauch aufgenommen. Das heißt, es wurden die Tiere mindestens zwei Tage pro Versuchsbedingung kontinuierlich gemessen.

Die Effekte der Periodenlänge auf den RQ wurden mit Hilfe der Varianzanalyse überprüft. In Abbildung 36 sind die gemessenen Mittelwerte des RQ unter den verschiedenen Periodenlängen für jeden Genotyp einzeln dargestellt.

Der statistische Test ergibt für die *mPer1* defizienten Tiere eine signifikante Unterscheidbarkeit aller Mittelwerte, mit Ausnahme der Daten von 24 h und 28 h. Der Eindruck einer Abnahme des respiratorischen Quotienten mit steigender Periodenlänge wird durch die Statistik bestätigt. Allein der Datenpunkt bei 24 h bricht aus diesem Muster aus. Er ist signifikant niedriger als die beiden umgebenden Punkte bei 22,5 h und 26 h. Dieser Kurvenverlauf findet sich in ähnlicher Form auch bei den *mPer2* Mäusen. Hier sind ebenfalls alle Werte signifikant verschieden, ausgenommen die Mittel bei 22,5 h und 26 h. Auch zeigt

sich wieder der signifikante Einbruch bei 24 h. Die Beobachtung der mit zunehmender Periodenlänge fallenden RQ Werte wird auch durch die Statistik bestätigt. Bei den Wildtyp Mäusen verhält es sich ähnlich. Alle Datenpunkte sind unterscheidbar, nur nicht die Werte bei 24 h und 30 h. Der Trend zu niedrigeren respiratorischen Quotienten bei längeren Zeitgeberperioden findet sich ebenfalls. Allerdings nicht so klar wie bei den *mPer* defizienten Tieren. So sind die extremsten Werte bei 19 h und 30 h diesem Trend entgegengesetzt.

Abbildung 37 zeigt den Vergleich des RQ aller Genotypen unter konstanten Lichtbedingungen. Die statistische Auswertung ergibt eine signifikante Unterscheidbarkeit aller Datenpunkte. Im Dauerlicht sind bei allen Gruppen niedrigere Werte zu messen als unter Dauerdunkelbedingungen und die *mPer1* Tiere zeigen den jeweils niedrigsten RQ.

Der Vergleich des RQ aller Genotypen über die getesteten Periodenlängen kann einen signifikanten Unterschied aller Datenpunkte zeigen. Es unterscheiden sich also alle Werte aller Gruppen zu allen Zeiten. Die Tendenz zu einem niedrigeren RQ ist auch in dieser Darstellung deutlich. Der respiratorische Quotient der *mPer2* defizienten Mäuse liegt über dem gesamten Bereich über dem der *mPer1* Tiere.

Als Fazit lässt sich zusammenfassen, dass der respiratorische Quotient mit steigender Periodenlänge niedriger wird. Dieser Trend wird aber bei allen Gruppen durch die Werte bei 24 h unterbrochen, hier finden sich jeweils signifikant geringere Mittelwerte. Der RQ der *mPer2* defizienten Tiere liegt in jedem Fall über dem der *mPer1* Mäuse.

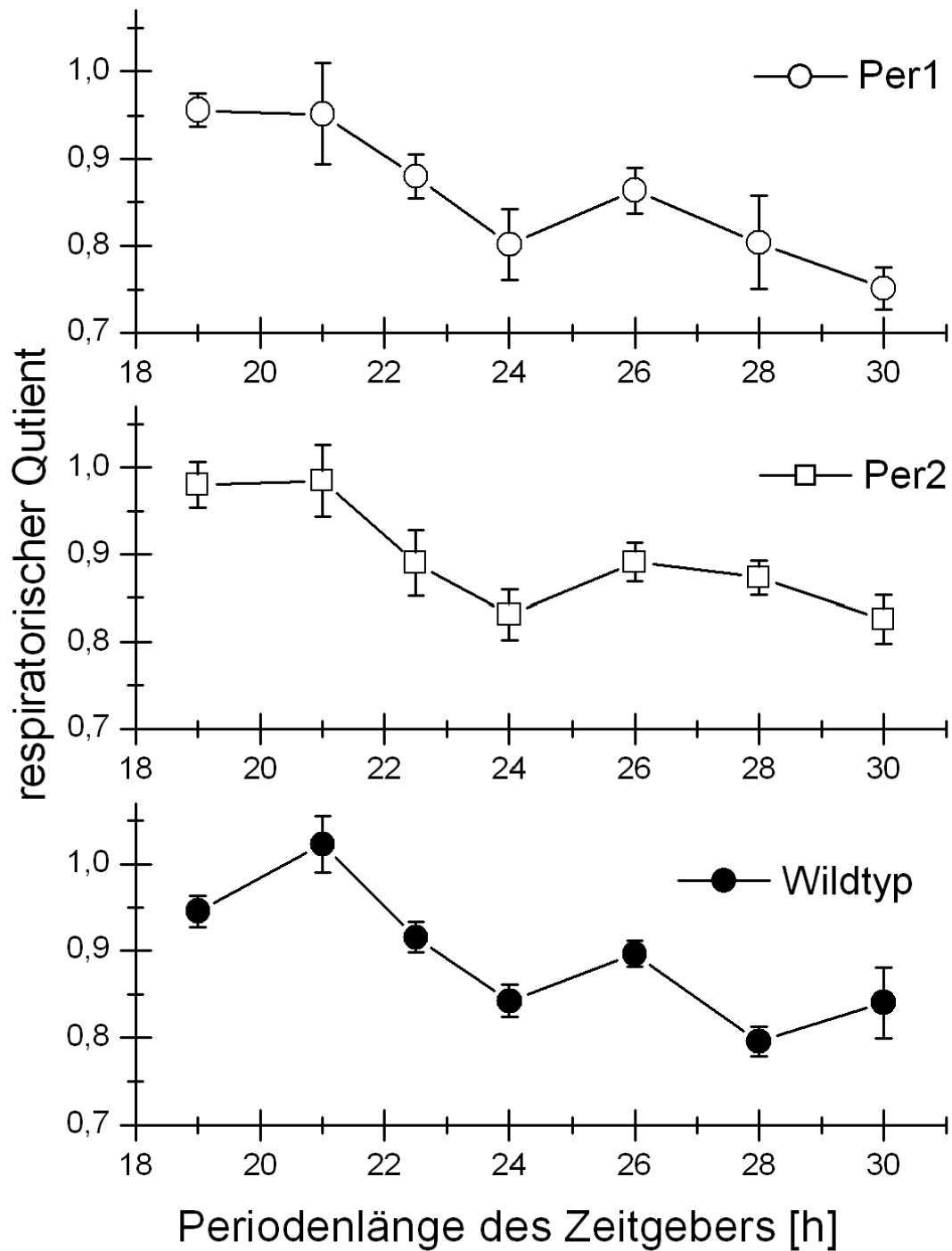


Abbildung 36: Mittlerer respiratorischer Quotient der Genotypen bei verschiedenen Periodenlängen des externen Zeitgebers. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

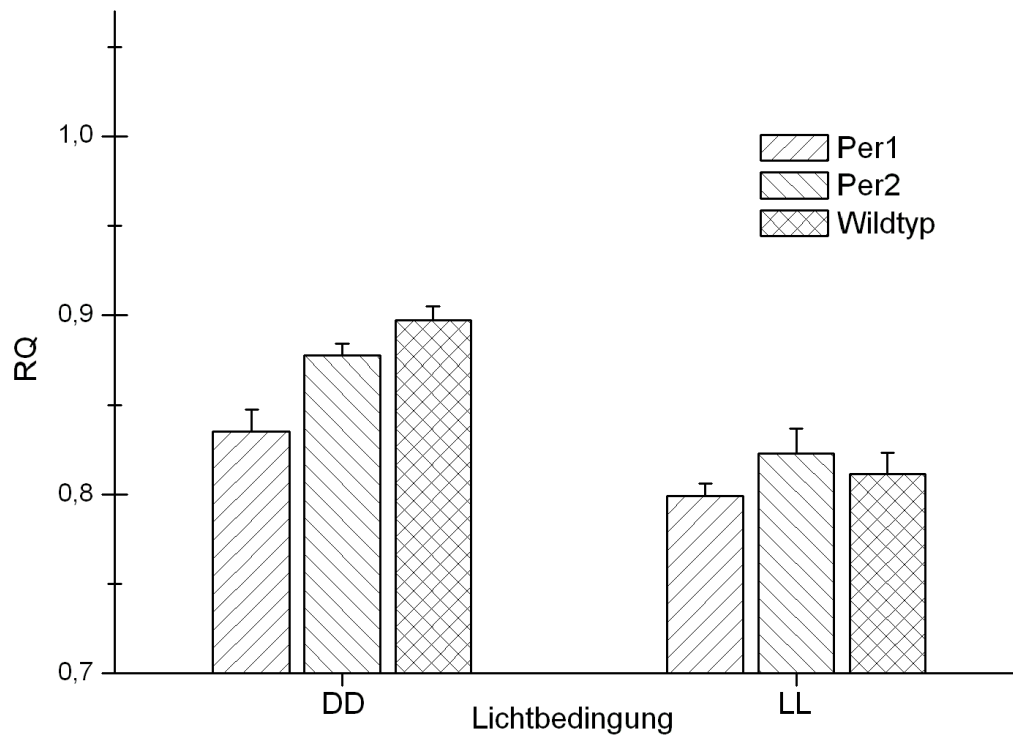


Abbildung 37: Mittlerer respiratorischer Quotient der Genotypen bei konstanten Lichtbedingungen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Messungen am Zwerghamster

Die exemplarischen Messungen der verschiedenen physiologischen Parameter parallel an einem Zwerghamster unter Kurztagbedingungen sollten das Zusammenspiel der verschiedenen Größen unter den circadian wechselnden Bedingungen darlegen. Daher wurde ein Tier ausgewählt, das regelmäßig Torpor, also die Tagesschlaflathargie zeigte. In Abbildung 38 sind die gemessenen Größen anhand einer Zeitachse übereinander dargestellt. So lassen sich die Wechselwirkungen der Größen am Besten ablesen.

Sehr deutlich zeigt sich das Zusammenspiel bei dem Vergleich der Aktivität mit den anderen Parametern. Jede Tendenz in der Aktivität findet sich klar im Sauerstoffverbrauch und der Herzfrequenz wieder. Auch in der Körpertemperatur spiegelt sich die Aktivität. Selbst der RQ reagiert mit der Aktivität. Die Zusammenhänge der Aktivität mit der Herzfrequenz und dem Sauerstoffverbrauch sind offensichtlich; Aktivität ist anstrengend und kostet Energie. Dass bei Aktivität auch Wärme frei wird, zeigt der Körpertemperaturverlauf. Wichtig ist hierbei allerdings festzustellen, dass dieses keinen monokausalen Zusammenhang darstellt. So konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Hamster schon vor Beginn der Aktivitätsphase ihre Körpertemperatur erhöhen (Scherbart, 2000). Ein zusätzlicher Effekt könnte die calorogene Wirkung der Nahrung sein, da die Tiere in der aktiven Zeit zumeist mit Fressen beschäftigt sind. Es soll hier vielmehr die Verquickung der Parameter gezeigt werden. Die Erhöhung des respiratorischen Quotienten mit Aktivitätszunahme könnte auch mit Fressen erklärt werden. Der postprandiale RQ liegt, sofern die Nahrung kohlenhydratreich war, etwa bei 1. Während der Ruhephase wird vermehrt auf das Körperfett als Energiespeicher zurückgegriffen. Der RQ bei Fettverbrennung liegt bei 0,7 was die Verringerung des RQ in den Zeiten mit geringer Aktivität erklären kann (Kleiber, 1967).

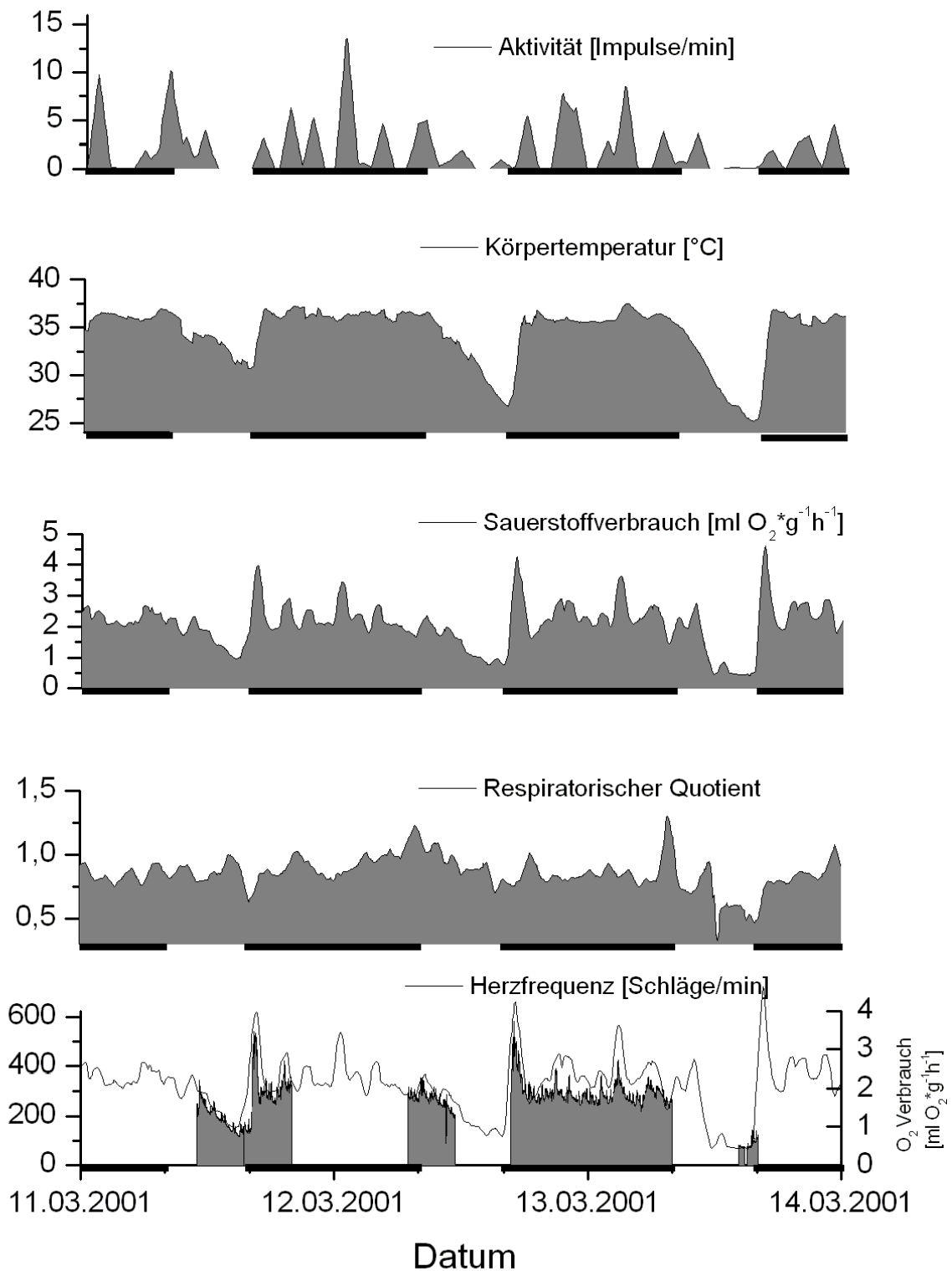


Abbildung 38: Darstellung der parallel gemessenen physiologischen Größen bei einem Zwerghamster unter Kurztagbedingungen. Gezeigt ist ein Zeitraum von drei Tagen, während derer das Tier regelmäßig Torpor zeigte. Der Hamster wurde bei konstant 18 °C gehalten, die schwarzen Balken symbolisieren die Dunkelphasen.

Ein Effekt, der sich mehr oder weniger klar in allen Größen zeigt, ist der ultradiane Rhythmus mit einer Periodenlänge von etwa 3,5 Stunden, oder sieben Zyklen pro Tag. Ultradiane Rhythmen werden für verschiedene Spezies beschrieben. Bei Ratten findet sich eine Änderung der Aggressivität im ultradianen Wechsel (Haller, 2000), und auch beim Menschen wird z.B. bei Insulin und Glucagon eine Periodizität von 110 Minuten gemessen (Kern et al., 1996). Oklejewicz et al. (2001) finden bei Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) einen ultradianen Fresszyklus, der eine Periodenlänge von 148 Minuten hat. Fressen ist auch eine plausible Erklärung für die ultradiane Periode des hier gezeigten Hamsters. Der Aktivitätsplot zeigt dieses besonders deutlich, aber zu finden ist der Effekt in jeder der gemessenen Größen. Interessant ist, dass mit diesem ultradianen Rhythmus auch eine Erklärungsmöglichkeit für die beschriebenen Erhöhungen des Stoffwechsels bzw. Sauerstoffverbrauchs während des Torpors gegeben ist. Die Maxima dieses Zyklus fallen auf dieselben Zeitpunkte. Dieses wird in der Hellphase des 11.03. besonders deutlich. Das Tier war nach dem Einschalten des Lichts bereits am Auskühlen und zeigte auch kaum noch Aktivität. Plötzlich heizt es wieder hoch, was durch einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und der Aktivität begleitet wird. Erst dann setzt der Torpor erneut ein. An diesem Tag sank die Körpertemperatur nur bis auf 30 °C ab.

Die massivsten Effekte sind aber durch den Torpor gegeben. Diese Tagesschlaflethargie können die Hamster zeigen als wirksame Maßnahme, um Energie zu sparen (Heldmaier und Steinlechner, 1981 sowie Heldmaier und Ruf, 1992 sowie Kaufmann et al., 2001). Hierbei verringern sie ihren Stoffwechsel während der Ruhephase; dies bedingt eine Auskühlung des Tieres. Zu Beginn der Aktivitätsphase betreiben die Hamster mit Hilfe des braunen Fetts und über Muskelzittern massiv Thermogenese und heizen so bis zur Normothermie auf.

In dem gewählten Zeitraum von drei Tagen zeigte der Hamster jeweils in seiner Ruhephase Torpor. Am Deutlichsten ist dies an der Körpertemperaturkurve zu erkennen. Aber auch in den andern Kurven sind die massivsten Änderungen und größten Steigungen durch den Torpor bedingt. Selbst in der Aktivitätsdarstellung erkennt man die torpiden Tiere. Allerdings haben sich auch die ausgekühlten Hamster noch bewegt, die Kurve zeigt besonders am 12.03. Aktivität bei auskühlenden Tieren. Diese Messung kann auch durch Beobachtung bestätigt werden. Torpide Hamster können sich durchaus koordiniert bewegen und fallen oft nur durch ihre halbgeschlossenen Augen auf.

Der Torpor bedingt aber auch bei den Parametern Sauerstoffverbrauch und Herzfrequenz starke Veränderungen. Die Auswirkungen auf diese Größen sind sehr ähnlich, weshalb sie

hier gemeinsam behandelt werden. Mit Beginn der Tagesschlaflathargie sinken beide Werte kontinuierlich ab. Auf die hier festgestellten Besonderheiten wird unten eingegangen. Mit dem Ende des Torpors und dem für die Thermogenese notwendigen Stoffwechsel zeigt sich die Leistungsfähigkeit der Hamster. Die Herzfrequenz steigt bei dem ausgekühlten Tier von 70 BpM um das 7fache auf 500 BpM, der Sauerstoffverbrauch von  $0,5 \text{ mlO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$  um das 9fache auf  $4,6 \text{ mlO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Das EKG (Abbildung 25) zeigt, dass die Erhöhung der Frequenz hauptsächlich durch die Verringerung des Abstands zwischen zwei Herzmuskelkontraktionen erreicht wird, die Form der Erregungsleitung im Herzen aber weitgehend konstant gehalten werden kann. Problematischer zu interpretieren ist der Verlauf des respiratorischen Quotienten. Deutlich ist ein Absinken zum Ende der Ruhephase zu erkennen. Dies ist damit zu erklären, dass  $\text{CO}_2$  sich leichter im Blut der auskühlenden Tiere löst und nicht mehr abgeatmet wird. Dieser Effekt sollte den RQ während des Aufheizens auch erhöhen, da nun das  $\text{CO}_2$  ausgetrieben wird. Dieses ist allerdings nicht deutlich zu erkennen. Begründet werden könnte dies damit, dass der pH des Blutes relativ konstant gehalten wird (Malan et al., 1973) und sich somit nicht so große Mengen Kohlensäure bilden können. Zum anderen dient während des Aufheizens Fett als Energielieferant, womit der RQ auf 0,7 gesenkt wird. Der Umstand, dass die gemessenen RQ Werte während der Thermogenese über 0,7 liegen spricht dafür, dass alle Effekte beteiligt sein dürften. Den steilen Anstieg des RQ am Ende der Dunkelphase am morgen des 13.03. zu erklären, ist problematisch. Begründet ist der Anstieg durch eine Verringerung des Sauerstoffverbrauchs und nicht durch eine Erhöhung der Kohlendioxidabgabe, wie aus der  $\text{O}_2$  Kurve hervorgeht. Ein Messartefakt kann ebenso ausgeschlossen werden, da die Herzfrequenz ebenfalls zu dieser Zeit einen Einbruch zeigt. Diskutiert wird ein Absinken des RQ vor Torporereignissen auf Werte um 0,6. Nestler (1990) misst diese Werte bei der Hirschmaus (*Peromyscus maniculatus*) direkt vor dem Torpor, ebenso wie Ortmann (1997) bei Murmeltieren (*Marmota marmota*) im Laboratorium vor Eintritt in den Winterschlaf. Begründet wird dieser Abfall des RQ mit einer Retention des Kohlendioxids (Elvert und Heldmaier, 2000), was zu einer Azidose führt, die die Thermogenese hemmt. Während des Auskühlens finden sich dann konstante oder erhöhte RQ Werte, die durch das nun abgegebene  $\text{CO}_2$  entstehen. Einen solchen Kurvenverlauf kann man auch bei den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen erkennen.

Der Anstieg des RQ über 1,0 bei der Aktivitätsphase am morgen des 12.03. könnte mit vermehrter Nahrungsaufnahme zu erklären sein. Während der Aktivitätsphase fressen die



Hamster; bei der dann möglichen Einlagerung von Körperfett steigt der RQ auf Werte deutlich über 1,0.

Bei der Betrachtung der Körpertemperatur am 11. und 12.03. während des Abkühlens fällt der lineare Verlauf auf, der bis zum erneuten Aufheizen keine Plateauphase erreicht. Die bisherigen Messungen (Ruf, 1991) zeigen einen exponentiellen Abfall der Körpertemperatur zumeist bis auf ein niedriges Niveau, wo die Temperatur bis zum Aufheizen konstant gehalten wird. Der exponentielle Abfall ist durch das passive Auskühlen bedingt, da der Stoffwechsel zu Beginn des Torpors bereits sehr schnell auf ein niedriges Niveau gesenkt wird. Die Steigung hängt von der Außentemperatur und somit von der Temperaturdifferenz ab. In den hier gezeigten Fällen hat es aber den Anschein, als würde sich der Hamster vorsichtig „heruntertasten“. Die Steigung der Temperaturkurve bleibt über den gesamten Bereich annähernd gleich und es kommt sogar zu dem beschriebenen Anstieg der Temperatur und anderer Parameter. Diese Beobachtung des „Heruntertastens“ kann auch bei Betrachtung des Sauerstoffverbrauchs und der Herzfrequenz gemacht werden. Sie sinken ebenso linear und zeigen nicht das schnelle Umschalten auf den hypometabolischen Stoffwechsel des Torpors. Lediglich das Torporereignis am 13.03. zeigt den ansonsten typischen Verlauf, hierbei werden auch die tiefsten Temperaturen gemessen.

Diese Beobachtung lässt sich nun verschieden interpretieren. Zum einen könnte das Tier gestört worden sein oder war nicht gesund und hat daher nicht den bekannten Verlauf gezeigt. Eine Störung ist im Nachhinein natürlich nie auszuschließen. Die Tatsache, dass das Tier noch Monate mit den Sendern gemessen wurde und bis zum Schluss unauffällig war, spricht gegen eine Krankheit. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass der Hamster „Test Drops“ gemacht hat. Dieses Phänomen wird von Winterschläfern zu Beginn und Ende des Winterschlafs gezeigt (Arnold, 1995). Die im Freiland gemessenen Murmeltiere (*Marmota marmota*) begannen den Winterschlaf mit einer Art *daily* Torpor, der immer tiefer wurde und schließlich in den mehrwöchigen Winterschlaf überging (Dernbach, 1997). Diese Torpor Ereignisse werden als „Test Drops“ bezeichnet. Ähnliches könnte auch der Hamster gezeigt haben. Allerdings lag der Messzeitpunkt im März. Zu diesem Zeitpunkt hat der Hamster schon über mehrere Wochen regelmäßig Torpor gezeigt. Von einem Phänomen, das typischerweise zu Beginn der Wintersaison gezeigt wird, kann also nicht gesprochen werden. Es ist aber durchaus möglich, dass die verschiedenen Spezies „Test Drops“ in unterschiedlichen Zusammenhängen zeigen. Eine interessante Erklärung wäre die Möglichkeit von verschiedenen Strategien des Energiesparens zu sprechen. Den Einsparungen während des

Torpor stehen hohe Kosten an dessen Ende für das Hochheizen entgegen. Die Energiebilanz eines „heruntergetasteten“, eines gradierten Torpors ist vielleicht günstiger, da die Tiere nicht so weit auskühlen. Um diese Berechnungen fundiert anstellen zu können, wären wesentlich mehr Daten erforderlich. Trotzdem soll hier ein Vergleich angestellt werden. Der mittlere Sauerstoffverbrauch in den drei Tagen in der Zeit von 8:00 Uhr morgens, als das Licht anging, bis 18:00 Uhr abends, wenn die Tiere nach dem Aufheizen wieder normotherm waren, war folgendermaßen:

1,946 ml  $O_2g^{-1}h^{-1}$  am 11.03., 1,752 ml  $O_2g^{-1}h^{-1}$  am 12.03. und 1,766 ml  $O_2g^{-1}h^{-1}$  am 13.03. Damit brauchte das Tier an dem Tag mit der höchsten Temperatur im Torpor auch am meisten Energie. Die beiden anderen Tage liegen aber gleichauf, obwohl hier die verschiedenen Strategien genutzt wurden. Eine weniger tiefe Körpertemperatur am Ende des Torpors hätte für den Zwerghamster eine weitreichende ökologische Bedeutung. Die Aufheizzeit würde kürzer werden und ein weniger ausgekühlter Hamster ist auch nicht so gefährdet wie ein Tier in tiefem Torpor.

Ein weiterer Punkt ist in dem Fall des linearen Absenkens der Körpertemperatur von Interesse. Diese lineare Absenkung ist offensichtlich durch das Tier gesteuert. Dieses würde eine kontinuierliche Veränderung des Temperatur Sollwertes, also des Temperatur Setpoints, bedeuten. Die bisherigen Messungen haben ein direktes Umschalten dieses Sollwertes zu Beginn des Torpors auf das spätere Temperaturniveau angenommen bzw. die Existenz eines solchen Setpoints kontrovers diskutiert (Briese, 1998). Zu klären wäre auch die Frage, wie die Hamster reagieren, wenn sie nicht durch das Ausschalten des Lichts am Ende der Ruhephase in die Aktivität „getrieben“ werden. Wie weit würden sich die Hamster heruntertasten und wann würden sie wieder aufheizen?

Torpor zeigt *Phodopus* nur, wenn er sich ungestört und sicher fühlt. Die Tatsache, dass ein Drittel der besenderten Tiere diese Verhaltensweise während der Messungen zeigte, was die Norm ist, spricht für den geringen Grad an Beeinflussung durch die Messapparaturen. Dies war das erklärte Ziel.

## **4.2 Messungen an Mäusen**

Die Messungen an Mäusen dienten dazu, unter von 24 h abweichenden Periodenlängen, das Verhalten der gemessenen physiologischen Parameter im Kontext mit den periodischen Größen zu beschreiben und gegebenenfalls Zusammenhänge zu formulieren.

Die Informationen, die von den Tieren zur Verfügung standen, waren die Bewegungsaktivität, der Sauerstoffverbrauch und der respiratorischer Quotient. Diese wurden unter wechselnden Periodenlängen des externen Zeitgebers gemessen. Als Zeitgeber fungierte der Licht-Dunkel-Wechsel, der den stärksten Einfluss hat (Aschoff et al., 1975), während alle anderen potenziellen Zeitgeber, wie die Temperatur oder die Futterverfügbarkeit, konstant gehalten worden waren. Mit diesem Zeitgeber wurde beispielsweise eine Periodenlänge von 26 h erzeugt, indem nach 13 h Licht 13 h Dunkelheit folgten.

Isolierte Neurone aus dem SCN von Ratten oszillieren mit einer stabilen Periodenlänge zwischen 20 h und 28 h (Shirakawa et al., 2001). Aus diesem Grund wurden für den externen Zeitgeber Zykluslängen zwischen 19 h und 30 h gewählt. Damit sollte der zu erwartende physiologische Bereich und ein Stück über diesen hinaus abgedeckt werden. Nun war zunächst zu klären, ob die Tiere dem Zeitgeber gefolgt waren und ob überhaupt Aussagen über ein Verhalten unter den vorgegebenen Periodenlängen zu machen waren. Auf dieser Grundlage kann dann ein Einfluss der Periodenlänge auf die gemessenen Parameter diskutiert werden. So war von Interesse, die Bewegungsmenge und den Sauerstoffverbrauch pro Tag (24 h) in den Kontext mit der Periodenlänge zu stellen. Ein Einfluss auf den RQ war genauso zu prüfen wie die Stimmigkeit der Daten untereinander. Korreliert beispielsweise eine erhöhte Aktivität mit einem größeren Sauerstoffverbrauch? Nicht zu vergessen ist auch die Interpretation der unter Konstantbedingungen gewonnenen Daten. Im Folgenden soll nun auf diese Fragen eingegangen werden.

### **4.2.1 Mitnahmebereich**

Aus den Aktivitätsdaten und den Messungen des Lichtregimes wurden die periodischen Größen  $\tau$  und Rhythmusstabilität der Tiere berechnet. Diese Daten bilden die Grundlage für Aussagen über das Verhalten der Tiere bei den verschiedenen Umgebungsbedingungen. Bevor jedoch nicht geklärt war, ob die Mäuse dem vorgegebenen Rhythmus folgten, konnten auch keine weitergehenden Rückschlüsse angestellt werden. Im Kapitel 3.2.2 Mitnahmebereich sind die einzelnen Genotypen dargestellt. Bei der Betrachtung des Mitnahmebereichs fällt

sofort die Kurve der Wildtypen ins Auge. Sie zeigen einen Mitnahmebereich, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die Tiere einem Zeitgeber nur begrenzt folgen können. Auf Periodenlängen unter 22,5 h und über 26 h können sie nicht synchronisieren. Der Graph der Wildtypmäuse flacht in den Extrembereichen ab, während die Streuung zunimmt. Bei der Betrachtung der Aktogramme aus diesem Bereich finden sich Effekte wie relative Koordination, also ein Versuch der Synchronisierung an das Lichtregime, oder ein komplettes Masking (Mrosovsky, 1999). Dieses Ergebnis wird durch die Befunde in der Rhythmusstabilität (siehe Kapitel 3.2.3 Rhythmusstabilität unter Licht-Dunkel Wechsel) bestätigt. Die Wildtypen zeigen einen stabilen Rhythmus bei den Periodenlängen, denen sie folgen können. In den Bereichen über 26 h und bereits unter 24 h fällt die Stabilität des Rhythmus signifikant ab. Bei den Wildtypen ist also ein Verhalten z.B. bei einem  $\tau$  von 21 h nicht messbar, da diese Tiere überhaupt nicht mit einem solchen Lichtregime synchronisieren. Es kann aber generell eine Aussage getroffen werden, wie diese Tiere unter bestimmten Periodenlängen reagieren, auf die sie zwar nicht synchronisieren können, die sie aber sehr wohl wahrnehmen. Im Anhang in Abbildung 43 und Abbildung 44 sind die zeitauflösende Mittelwertskurve des Sauerstoffverbrauchs und der respiratorischen Quotienten jeweils gegen die Bewegungsaktivität angetragen. Aus diesen Daten geht deutlich hervor, dass die Wildtypen auf das Licht reagiert haben. Vergleiche von Datenpunkten aus den Extrembereichen, in denen die Tiere nicht synchronisiert waren, mit anderen Daten sind daher sinnvoll.

Die *Per*-mutierten Tiere zeigen bei Betrachtung des Mitnahmebereichs ein ganz anderes Bild. Besonders die *mPer1* Mäuse synchronisieren ganz hervorragend auf alle angebotenen Periodenlängen, die *mPer2* Tiere streuen oberhalb von 26 h etwas. Die Regressionsgeraden mit einer Steigung von annähernd eins bestätigen dies. Die Abweichungsquadrate von  $R^2 = 0,991$  für *mPer1* und  $R^2 = 0,964$  für *mPer2* spiegeln wider, wie gut die gemessenen Werte auf der berechneten Geraden liegen. Die Standardabweichung bei den Extremwerten ist bei diesen beiden Gruppen ebenfalls wesentlich geringer als die der Wildtypen. Dieser Befund stützt die These, dass die mit nur einem Oszillator im SCN ausgestatteten Tiere offenbar wesentlich leichter auf verschiedene Photoperioden synchronisieren können. Diese Tiere können selbst Periodenlängen folgen, die sich nicht bei in Zellkultur isolierten SCN Neuronen von Wildtyp-Ratten gefunden haben. Stellt man sich ein mechanisches, gekoppeltes Pendel vor, erscheint dies nachvollziehbar: Ein System aus zwei Oszillatoren ist in sich stabiler aber von außen nur sehr begrenzt zu beeinflussen. Dagegen ist ein einzelner Oszillator oder eben ein einzelnes

Pendel einfacher auf einen externen Rhythmus zu synchronisieren. Fällt dieser externe Rhythmus oder Zeitgeber weg, so ist das System mit nur einem Oszillator instabiler als der intakte SCN. Dies zeigt sich besonders wenn das System mit einer ungünstigen Frequenz angestoßen wurde, bevor es in den Freilauf kam. Nach einiger Zeit lässt sich dann kein Rhythmus mehr feststellen. Dies ist bei den *Per2* Mutanten der Fall (Steinlechner et al., 2002b). Die Befunde von Steinlechner et al. (2002a), dass *Phodopus* nach Lichtpulsen in aufeinander folgenden Nächten arhythmisch werden, lassen sich ebenfalls mit der Theorie des Pendels erklären.

Die unlängst veröffentlichten Ergebnisse von Oster et al. (2002) unterstützen ebenfalls die These der zwei Oszillatoren im SCN. Er kann zeigen, dass *mPer2* Mäuse, denen der andere Part des zweiten Oszillatorsystems, das *Cry2* fehlt, im Dauerdunkel rhythmisch bleiben. Die *Per2* Tiere sind unter diesen Bedingungen zumeist arhythmisch geworden. Ein unbeeinflusster, erster Oszillator kann hier offenbar stabil schwingen.

Somit sind bei den Mutanten Messungen unter  $\tau$  Zyklen möglich, die mit den Wildtypen nicht erreicht werden können. Der Befund der großen Flexibilität der *Per* Mutanten wirft natürlich die Frage nach Masking auf. Kann ausgeschlossen werden, dass der externe Rhythmus von den Tieren gar nicht „verinnerlicht“ wurde, sondern, dass sie ihm nur gefolgt sind? Vielleicht war ihr endogener Rhythmus ja ganz anderes aber zu schwach, sich gegen den starken Zeitgeber Licht durchzusetzen? Die Betrachtung der Aktogramme in der Übergangszeit von der Photoperiode zum Dauerdunkel gibt hier Sicherheit. Die Mutanten setzten ihren Rhythmus ohne Phasenverschiebung zum vorausgegangenen Zeitgeberrhythmus fort (siehe Abbildung 3 und Abbildung 31). Dadurch ist bewiesen, dass sie synchronisiert waren. Dieses Ergebnis wirft aber auch die Frage auf, wie der Mitnahmebereich der *mPer* Mutanten bei weiter variierten Photoperioden verläuft. Eine Prognose ist u. U. mit Hilfe der im folgenden Kapitel behandelten Daten möglich.

Die Tatsache, dass die *mPer* defizienten Tiere so gut an das Licht synchronisieren können, legt nahe, dass sie unter den verschiedenen Bedingungen eine konstant hohe Rhythmusstabilität zeigen sollten. Die ist aber nicht der Fall, der Kurvenverlauf zeigt auch bei diesen Tieren eine verringerte Stabilität des Rhythmus bei den extremeren Periodenlängen. Die gemessenen Werte liegen aber alle über oder zumindest auf gleichem Niveau wie die Daten der Wildtypen. Das bedeutet, sie kommen mit den verschiedenen Lichtbedingungen offenbar besser zurecht. Betrachtet man den Verlauf der Kurven der Rhythmusstabilität für die Mutanten genauer, so fällt bei den *mPer1* Tieren eine Rechtsverschiebung und bei den *mPer2*

Mäusen eine Linksverschiebung der Maximalwerte auf. Zwar ist mit den vorhandenen Daten nur die Rechtsverschiebung signifikant zu belegen, aber weitergehende Versuche würden wahrscheinlich auch die Linksverschiebung bestätigen. Dieser Befund unterstützt die Theorie des Morgen- und Abend Oszillators (Daan et al., 2001). Den *mPer2* Tieren fehlt dieses Gen, d.h. sie haben keinen intakten Abend Oszillator, sondern sind auf den Morgen Oszillator angewiesen. Dieser wird durch Licht beschleunigt und durch Dunkelheit abgebremst. Eine bessere Anpassungsfähigkeit an kürzere Periodenlänge ließe sich so erklären. Auch die Befunde im Dauerlicht (Steinlechner et al., 2002b) zeigen kürzere  $\tau$  bei diesen Tieren. Bei den *mPer1* Defizienten verhält es sich genau umgekehrt. Der Effekt ist hier besonders deutlich ausgeprägt. Den *mPer1* Mutanten steht nur der Abend Oszillator in Form des *mPer2* zur Verfügung. Dieser wird durch Dunkelheit beschleunigt und durch Licht verlangsamt. Diese Tiere können den längeren Perioden besser folgen und haben auch im Dauerlicht ein längeres  $\tau$ . Einer weiteren Verlängerung oder Verkürzung der Periode könnten die Mutanten wahrscheinlich nicht viel weiter folgen. Es wäre zu erwarten, dass die *mPer1* Gruppe noch längeren Perioden besser folgen würde als die *mPer2* Tiere und umgekehrt. Diese wäre in weiteren Versuchen zu untersuchen.

#### 4.2.2 After Effects

Ein weiteres Kriterium, um einzuschätzen, ob die Tiere mit dem Lichtregime synchronisiert waren, ist die Betrachtung der After Effects. Hierzu wurden die Tiere im Anschluss an einen Licht-Dunkel Wechsel im Dauerdunkel gehalten. Ohne den Zeitgeber von Außen zeigen die Mäuse nun Freilauf, d.h. ihr Rhythmus wird ausschließlich durch den SCN bestimmt. Bekannt war, dass die *mPer2* Mäuse im Dauerdunkel rasch arhythmisch werden und die *mPer1* Tiere ein  $\tau$  deutlich unter 24 h zeigen (Steinlechner et al., 2002b). Bei diesen Versuchen waren die Mäuse nach einem L:D 12:12 Rhythmus im Dauerdunkel gehalten worden. Die Frage war nun, ob das vorausgegangene Lichtregime einen Einfluss auf die Periodenlänge im Dauerdunkel haben würde. Bisher war bekannt, dass die Beleuchtungsstärke die Periodenlänge im Freilauf ( $\tau$ ) beeinflusst. Aschoffs Regel (1960) hat dies schon gefordert, Versuche an den *Per* Mäusen (Steinlechner et al., 2002b) haben dies auch gezeigt. Hierbei kann eine lineare Beziehung zwischen der Beleuchtungsstärke und dem  $\tau$  gebildet werden. Zu untersuchen war, ob diese Periodenlänge zusätzlich noch von der vorausgegangenen Photoperiode verändert werden kann. Falls sich bei der Periodenlänge im Dauerdunkel keine

Auswirkungen zeigen sollten, so bleibt noch zu klären, ob und wie sich die Vorbedingungen bei der Rhythmusstabilität auswirken. In Kapitel 3.2.4 After Effects sind die Ergebnisse dargestellt.

Eine Abhängigkeit der Periodenlänge im Dauerdunkel von den Vorbedingungen zeigt sich bei den Wildtypen und den *mPer1* Mutanten nicht sofort. Betrachtet man aber die Statistik, so finden sich signifikante Unterschiede. Das bedeutet, dass die Steigung von Null verschieden und positiv ist, also einen Effekt des vorangegangenen Lichtregimes. Allerdings sind die ermittelten Steigungen der Regressionsgeraden mit 0,09 bei den *mPer1* Tieren und 0,05 bei den Wildtypen denkbar gering. Bei Messungen der Abhängigkeit des  $\tau$  von der Helligkeit, dürften diese Unterschiede hinter den gravierenden Effekten der Beleuchtungsstärke verschwunden sein.

Bereits auf den ersten Blick werden die Auswirkungen bei den *mPer2* Mäusen deutlich. Bei diesen lässt sich nach den extremen Photoperioden kein  $\tau$  mehr messen, die Tiere sind alle arhythmisch, wie in den zitierten Experimenten auch. Von 21 h bis 26 h ist aber ein endogener Rhythmus feststellbar. Dieser hängt deutlich von der Periodenlänge der Vorbedingungen ab, wie die Steigung der Regressionsgeraden von 0,58 zeigt. Ein Fehlerquadrat ( $R^2$ ) von 0,53 zeigt aber, wie schwierig die Beurteilung ist. Dies liegt an der hohen Standardabweichung bei 21 h und 26 h. Der Wert bei 28 h ist nicht in die Berechnung eingegangen, da bei diesen Bedingungen nur noch ein Tier rhythmisch war. Die Streuung bei 22,5 h bei diesen Tieren ist sehr niedrig. Alle *Per2* Mäuse zeigten hier ein  $\tau$  von ebenfalls 22,5 h. Dieser Befund ist sehr interessant, da damit gezeigt werden kann, dass die *mPer2* Tiere im Dauerdunkel nicht zwingend arhythmisch werden müssen. Hinzu kommt, dass alle Tiere nach dem 22,5 h Lichtregime diesen Rhythmus beibehalten haben. Eine plausible Erklärungsmöglichkeit ist, dass diese Periodenlänge genau die Frequenz des *Per1* Oszillators getroffen hat. Dieser musste in dem Fall des 22,5 h Lichtregimes nicht jeden Tag neu nachgestellt werden, sondern konnte stabil einschwingen. Diesen stabilen Rhythmus haben die Tiere im Dauerdunkel fortsetzen können. Die graduelle Zunahme der Standardabweichung je weiter der Messpunkt von 22,5 h entfernt ist, würde diese Theorie bestätigen.

Bei der Betrachtung des Einflusses der Vorbedingungen auf die Rhythmusstabilität fällt der Wert von 22,5 h bei den *mPer2* Mutanten wiederum sofort auf. Bei dieser vorausgegangenen Periodenlänge erreicht die Stabilität der Periodik ihr Maximum. Es liegt auf dem Niveau der sehr stabilen *Per1* Mäuse und signifikant über dem der Wildtypen. Bewegt man sich von dieser Periodenlänge weg, so wird die Rhythmusstabilität der *mPer2* Mutanten schnell

geringer, bis sie bei einer Veränderung der Zykluslänge um etwa 3 h ganz verschwindet. Dies unterstützt ebenfalls die oben formulierte These des *Per1* Oszillators mit einer Eigenfrequenz von 22,5 h.

Aber auch der Kurvenverlauf der beiden anderen Gruppen lässt sich interpretieren. Die *mPer1* Tiere haben einen stabilen Rhythmus, der kaum von den Vorbedingungen beeinträchtigt werden kann. Dies spiegelt den oben besprochenen Mitnahmebereich wider. Diese Tiere können sich auf den gesamten Bereich der getesteten Periodenlängen einstellen und bleiben auch im Nachhinein stabil. Im Freilauf zeigen sie dann ein von den Vorbedingungen kaum beeinflusstes  $\tau$ . Bei den Wildtypen spiegelt sich der Verlauf der Rhythmusstabilität unter Licht-Dunkel Wechsel und der Mitnahmebereich wider. Auch hier sinkt die Qualität der Periodik unterhalb von 24 h und über 26 h ab. Dies sind die Bereiche, in denen Masking und relative Koordination beobachtet wurden. Die Bereiche hoher Rhythmusstabilität zwischen 24 h und 26 h werden auch durch die gemessenen  $\tau$  der Wildtypen im Freilauf bestätigt. Dennoch überrascht die gemessene Rhythmusstabilität der Wildtypen, da Mäuse als nachtaktive Säuger zu einem kürzeren  $\tau$  im Freilauf unter Dauerdunkel tendieren (Aschoff, 1960). Die Befunde in dieser Arbeit können z.B. in dem genetischen Hintergrund der gemessenen Mäuse begründet liegen.

Die drei Gruppen lassen sich bezüglich der Synchronisierbarkeit und der After Effects eindeutig klassifizieren. Die *mPer1* Mutanten sind die eindeutig rhythmusstabilsten Tiere, sie können über den gesamten Bereich synchronisieren und bleiben auch im Dauerdunkel stabil bei einer Periodenlänge von etwa 24 h. Die Wildtypen erreichen nicht die Rhythmusstabilität der *mPer1* Tiere. Sie sind nur in den Grenzen von 24 h bis 26 h Periodenlänge deutlich stabil. Auch das gemessene  $\tau$  der Wildtypen beweist ihre geringe Flexibilität, sich auf extreme Periodenlängen einzustellen. Im Dauerdunkel zeigen sie eine ähnliche Periodenlänge wie bereits die *mPer1* Tiere, sind dabei aber nicht so stabil in ihrem Rhythmus. Die *mPer2* Mutanten schließlich stellen offensichtlich die in Bezug auf den endogenen Rhythmus labilste Gruppe dar. Sie lassen sich beinahe genauso gut synchronisieren wie die *mPer1* Tiere und haben unter Licht-Dunkel Wechsel daher auch einen stabilen Rhythmus. Im Freilauf wird die Sensibilität aber deutlich. Statt des relativ konstanten  $\tau$  der Vergleichsgruppen ist hier eine starke Abhängigkeit von dem vorhergehenden Lichtregime zu beobachten. Im Bereich um die vermutliche Periodenlänge des verbliebenen *Per1* Oszillators können diese Mäuse den Rhythmus stabil aufrechterhalten, in den anderen Fällen werden sie arhythmisch.



Die Beobachtung eines  $\tau$  deutlich unter 24 h bei den *mPer1* Tieren (Steinlechner et al., 2002b) lies sich nicht wiederholen. Allerdings ergaben die Messungen dasselbe Muster wie die zitierte Arbeit. Das heißt, die Tendenzen der einzelnen Genotypen bezüglich des  $\tau$  sind identisch, lediglich der Betrag der gemessenen Periodenlängen ist größer. Es werden also generell längere Perioden gefunden. Dies könnte ebenfalls an einer eventuellen Variation des genetischen Hintergrundes der Tiere liegen oder aber auch an etwas anderen Haltungsbedingungen. So könnten beispielsweise Veränderungen der Lichtstärke oder -farbe Effekte hervorrufen (Klante und Steinlecher, 1995).

### 4.2.3 Bewegungsaktivität

Nachdem geklärt ist, inwieweit die einzelnen Gruppen zu synchronisieren waren, sollen hier nun die Effekte der Variation des Lichtregimes auf die Aktivität diskutiert werden. Die Bewegungsaktivität stellt den Parameter dar, der kontinuierlich über die gesamte Zeit bei allen Tieren gemessen wurde. Diskutiert wird die Bewegungsaktivität anhand der Summe der Impulse der Bewegungssensoren über 24 h. Die Frage ist, was für Ergebnisse zu erwarten gewesen sind. Oklejewicz et al. (1997) haben bei den  $\tau$  Mutanten der Goldhamster die Bewegungsaktivität im Freilauf aufgenommen. Leider benutzen sie diese ausschließlich zur Bestimmung des  $\tau$  der Tiere, stellen aber keinen Vergleich der Bewegungsaktivitätsmenge an. Refinetti und Menaker (1997) messen ebenfalls an den  $\tau$  mutierten Goldhamstern die Laufradaktivität und finden zwar eine andere Verteilung der Aktivität über den Tag, aber keinen Unterschied in der Aktivitätsmenge. Zu beachten ist auch, dass es sich bei diesen Versuchen um eine andere Spezies und eine  $\tau$  Mutante handelt. Die Daten, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, stammen von Mäusen, die nicht im Freilauf aus einem 24 h Tag heraus waren, sondern auf eine abweichende, externe Periodenlänge synchronisiert wurden. Eine Vergleichbarkeit kann daher nur begrenzt erwartet werden. Ein Ergebnis, das zu erwarten gewesen wäre, ist, dass die Mäuse ihre Aktivitätsmenge pro Tag an die Periodenlänge anpassen. Bei einer Zykluslänge von 30 h würde dies bedeuten, die Mäuse hätten pro 24 h Tag nur noch 24/30tel der Aktivitätsmenge, die sie unter 24 h Zyklusdauer gezeigt haben. Die Ergebnisse (siehe Kapitel 3.2.1 Aktivitätsmenge) können diese Theorie aber nicht bestätigen. Vielmehr zeigen sie einen deutlichen Unterschied im Verlauf der Kurven für die *Per* Mutanten und die Wildtypen. Zur Veranschaulichung sollen in Abbildung 39 die Daten nochmals gezeigt werden. Die nach der Theorie zu erwartenden Aktivitätsmengen sind als

zusätzlicher Graph in der Zeichnung dargestellt. Der Kurvenverlauf beider Mutanten Gruppen zeigt bei den zentralen Periodenlängen erhöhte Werte und zu den extremen Zykluslängen hin signifikant weniger Bewegungsaktivität pro 24 h. Die Wildtypen dagegen haben eine weitgehend konstante Aktivitätsmenge gezeigt. Der Unterschied zwischen Mutanten und Wildtypen bei den zentralen Periodenlänge ist signifikant und die *mPer2* Tiere zeigen den jeweils höchsten Wert. Dies gilt auch für die Konstantbedingungen. Bei dem Vergleich der theoretischen Werte mit den gemessenen fällt auf, dass bei Periodenlängen über 24 h durchaus eine Übereinstimmung der Kurvenverläufe zu erkennen ist. Bei den *mPer2* Mutanten ist dies besonders deutlich aber auch bei *mPer1* Mäusen und Wildtypen liegen die Theoriewerte klar innerhalb der Standardabweichung. Bei Periodenlängen unter 24 h ändert sich das Bild aber drastisch. Hier kann nicht mehr von einer Übereinstimmung gesprochen werden, da bereits die Steigung der Kurven differiert. Es findet offenbar ein Strategiewechsel im Verhalten der Mäuse statt. Zu erwarten wäre gewesen, dass die Bewegungsmenge nun über das Niveau von 24 h hinaus ansteigt. Stattdessen fällt sie mit jeder Verkürzung der Periodenlänge weiter ab. Auf welche Weise es zu der vermehrten Bewegungsaktivität der Mutanten gekommen ist, lässt sich hier nur vermuten. Eine Möglichkeit ist, dass bestimmte Verhaltensweisen vermehrt aufgetreten sind, eine andere, dass eine insgesamt höhere Aktivität gezeigt wurde. Hinweise kann die Betrachtung der Verteilung der Bewegungsaktivität über den Tag geben. Im Anhang in Abbildung 43 und Abbildung 44 ist der Verlauf der Aktivität über den Tag für die verschiedenen Genotypen dargestellt. Es zeigt sich aber kein Unterschied im Tagesprofil zwischen den Gruppen. Alle reagieren mit einem Anstieg der Bewegungsaktivität zu Beginn der Dunkelfase. Ein Unterschied ist lediglich im Niveau zu erkennen. Das kann darauf hindeuten, dass alle Verhaltensweisen in gleicher Weise betroffen sind. Es wird eine weitere Erhöhung der Bewegungsaktivität, sowohl bei einer Verlängerung als auch bei einer Verkürzung der Periodenlänge, vermieden. Dieser Effekt ist allerdings nur bei den Mutanten zu beobachten, Wildtypen bleiben auf ihrem signifikant niedrigeren Niveau. Offensichtlich führt die Mutation zu einer vermehrten Bewegungsaktivität unter den genannten Bedingungen. Erst in den Randbereichen verschwindet der Unterschied. Dieses Ergebnis wirft natürlich die Frage nach den potenziellen Kosten einer solchen vermehrten Bewegungsaktivität auf.

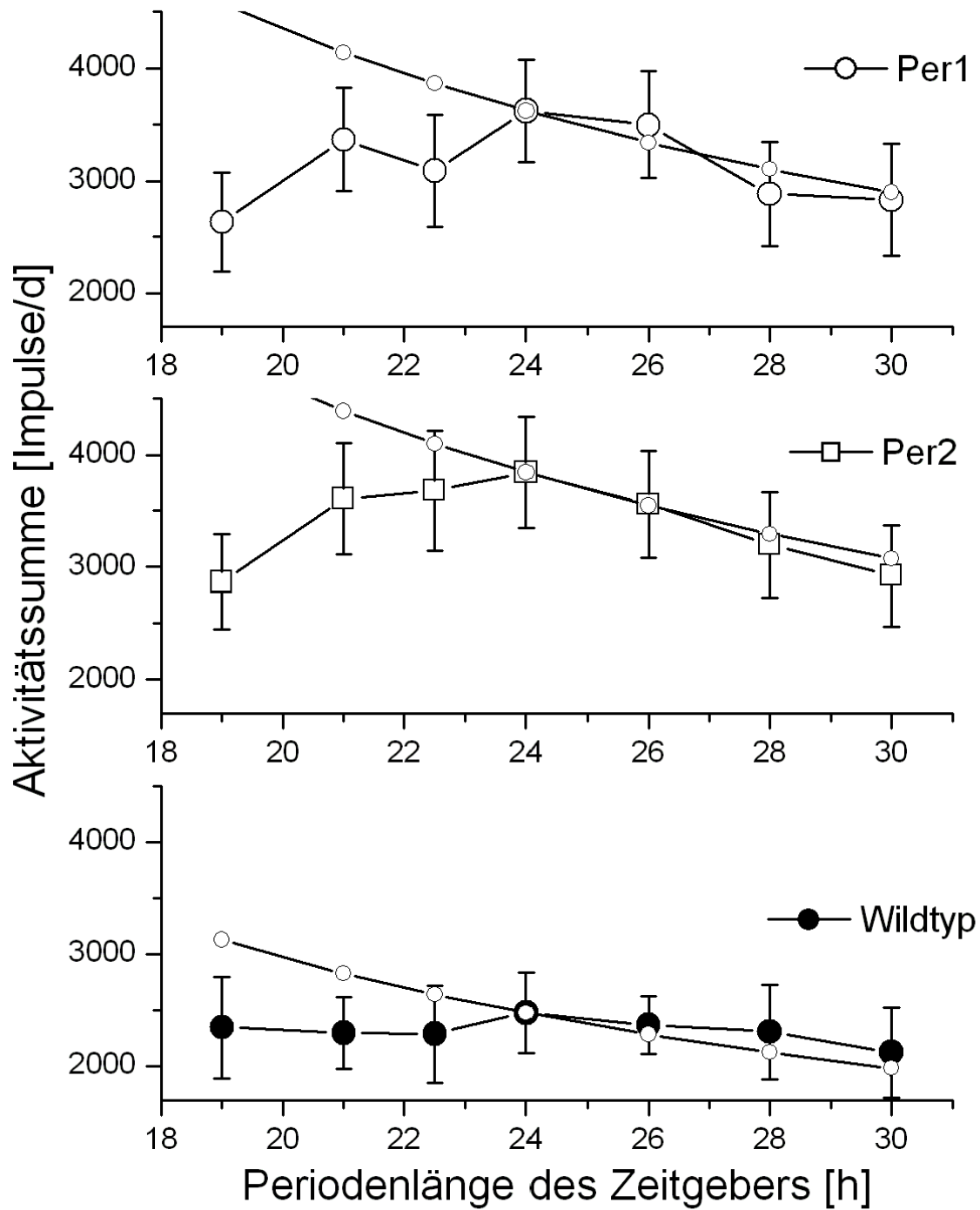


Abbildung 39: Summen der Bewegungsaktivität pro 24 h Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die kleinen offenen Kreise bezeichnen die zu erwartende Aktivitätsmenge bei einer direkten Abhängigkeit von der Periode des externen Zeitgebers.

#### 4.2.4 Sauerstoffverbrauch

Der mittlere Sauerstoffverbrauch pro Gramm und Stunde über 24 h wird als Maß für die umgesetzte Energie zugrunde gelegt. Mit seiner Hilfe soll der Einfluss der Periodenlänge auf den Stoffwechsel untersucht werden. Messungen des Metabolismus an den  $\tau$  Mutanten des Goldhamsters haben verschiedene Ergebnisse geliefert. Refinetti und Menaker (1997) finden keinen Einfluss der Mutation auf die pro Zeiteinheit umgesetzte Energiemenge. Oklejewicz et al. (1997) dagegen können bei ihren  $\tau$  Mutanten eine Abhängigkeit des Stoffwechsels vom Genotyp feststellen. Ein anderer Versuch von Oklejewicz et al. (2000) untersucht den Einfluss einer durch Deuterium verlängerten Periodenlänge auf die Stoffwechsellmenge. Hier finden sie keine Zusammenhänge. Wie die Mäuse reagieren würden war aber vollkommen unbekannt, da die Verhältnisse bei den  $\tau$  mutierten Goldhamstern im Freilauf nicht ohne weiteres auf die *Per* mutierten Mäuse unter einer Photoperiode (T-Zyklus) zu übertragen sind.

Bei den Ergebnissen der Sauerstoffverbrauchsmessungen sind zwei unterschiedliche Bedingungen zu unterscheiden. Zum einen der Freilauf, bei dem die Tiere ihre endogene Periodenlänge zeigten und zum anderen die T-Zyklen, bei denen die Tiere einem Zeitgeber gefolgt sind. Im Freilauf zeigen die Tiere ihre charakteristische Periodenlänge ( $\tau$ ), die von der Lichtstärke abhängt. Gibt es Unterschiede im Verhalten des Sauerstoffverbrauchs, wenn die Tiere ihrem eigenen Rhythmus folgen dürfen oder wenn sie auf eine fremde Periodenlänge synchronisiert sind? Hierzu müssen die Ergebnisse der Versuche unter Konstantbedingungen betrachtet werden, um festzustellen, ob sich bereits an dieser Stelle Zusammenhänge finden lassen, die sich dann in Beziehung zu den Messungen unter den T-Zyklen stellen lassen.

Die ermittelten Periodenlängen ( $\tau$ ) bei Tieren im Freilauf zeigt Abbildung 34 auf Seite 82. Die gewonnenen Daten lassen sich zunächst sehr gut mit denen des Versuchs von Steinlechner et al. (2002b) vergleichen. Deren Ergebnisse sind weitgehend bestätigt. Im Dauerlicht zeigen die *Per1* Mäuse ein längeres  $\tau$ , die *Per2* Mutanten ein kürzeres und die Wildtypen sind intermediär. Im Dauerdunkel zeigen die *Per2* Tiere ein signifikant kürzeres  $\tau$ , das von den After Effects nach 22,5 h rühren dürfte. Die beschriebenen Tendenzen (Steinlechner et al., 2002b) eines Anstiegs des  $\tau$  der *Per1* Mutanten bei steigender Lichtstärke und der entgegengesetzte, aber schwächere Effekt bei den *Per2* Tieren finden sich wieder.

Die Betrachtung der Ergebnisse des Sauerstoffverbrauchs unter Konstantbedingungen ist ebenfalls in Abbildung 34 dargestellt. Die statistische Auswertung der Mittelwerte des Sauerstoffverbrauchs ergibt bei allen Gruppen einen signifikant höheren Wert im Dauerdunkel im Vergleich zu Dauerlicht. Das kann damit zusammenhängen, dass die nachtaktiven Mäuse

durch das Dauerlicht eine reduzierte Aktivität zeigen. Ein Vergleich mit den Aktivitätsdaten und dem respiratorischen Quotienten unter Konstantbedingungen zeigt zwar einen höheren RQ im Dauerdunkel, aber nur für *Per1* und Wildtypen eine signifikant höhere Aktivitätssumme pro Tag unter Dauerdunkel. Damit kann die These der Verringerung der Aktivität durch Dauerlicht nicht eindeutig bestätigt werden.

Um die Frage nach einer Tendenz des Sauerstoffverbrauchs unter Konstantbedingungen nun zu klären, wurden die Sauerstoffverbrauchsmesswerte aus den Dauerdunkelversuchen gegen die Periodenlänge des vorausgegangenen Lichtregimes angetragen. Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet, es sollte allein der Kurvenverlauf per Augenschein ermittelt werden. In Abbildung 40 sind die Daten für die einzelnen Genotypen dargestellt. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Kurvenverläufe in Abbildung 40 ein Muster der im Kapitel 3.2.4 After Effects gezeigten Graphen des  $\tau$  oder der Rhythmusstabilität zeigt. Da die Wildtypen und die *mPer1* Tiere ein relativ konstantes  $\tau$  unter diesen Bedingungen gezeigt haben, wäre es möglich gewesen, dass der Sauerstoffverbrauch dies durch ein ebenso konstantes und niedriges Niveau widerspiegelt. Dies ist nicht der Fall. Ebenso lässt sich der charakteristische Verlauf der *mPer2* Gruppe nicht wieder finden.

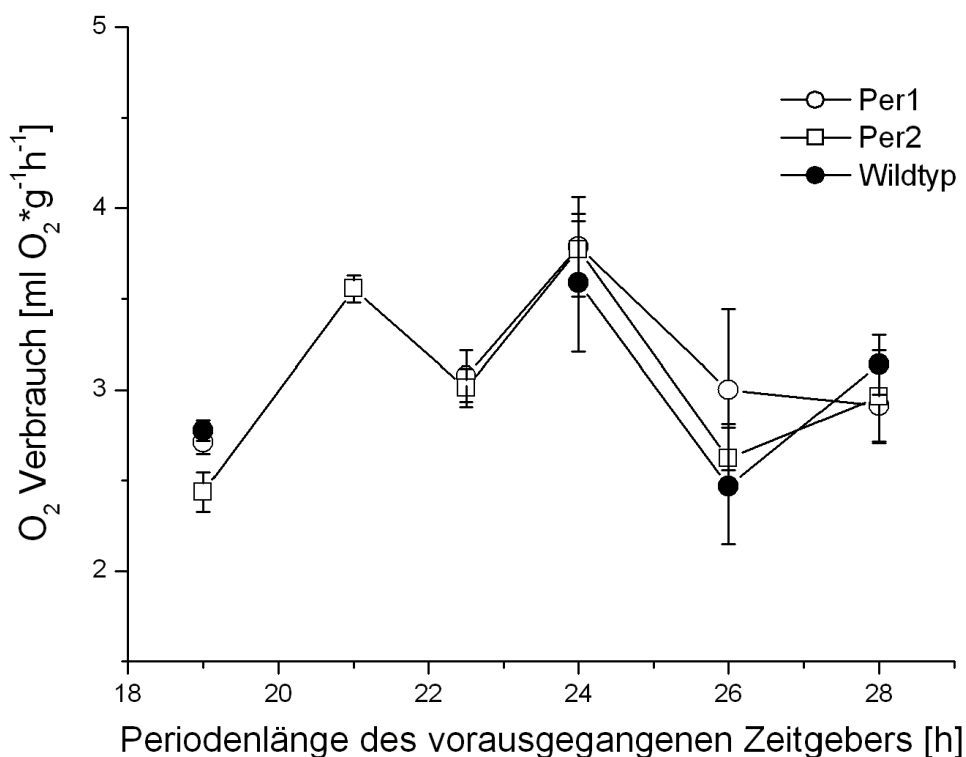


Abbildung 40: Sauerstoffverbrauch der Genotypen im Freilauf unter Dauerdunkel angetragen gegen das vorausgegangene Lichtregime.

Schließlich könnte die Betrachtung der zeitauflösenden Darstellung des Sauerstoffverbrauchs und des respiratorischen Quotienten unter Konstantbedingungen (siehe Anhang, Abbildung 47) noch Informationen bringen. Die hier gezeigten Graphen unter Konstantbedingungen unterscheiden sich sehr deutlich von denen im T-Zyklus ermittelten. Der Verlauf ist weniger strukturiert, die Amplituden geringer. Erhöht man die Auflösung, lassen sich Effekte der Parameter untereinander auch erkennen. Die Kurvenverläufe bestätigen auch die in den Ergebnissen gezeigten Mittelwerte, was angesichts des gleichmäßigen Verlaufs auch unter Konstantbedingungen nicht überrascht. Allerdings können alle diese Daten einen einheitlichen oder geringeren Sauerstoffverbrauch unter Konstantbedingungen nicht erkennen lassen.

Im Folgenden sollen nun die Sauerstoffverbrauchsmessungen unter den T-Zyklen behandelt werden. Aus den Aktivitätsmessungen steht bereits die Frage nach einem erhöhten Stoffwechsel der Mutanten gegenüber den Wildtypen, aufgrund der erhöhten Aktivitätsmenge in T-Zyklen um 24 h, im Raum. Eine Möglichkeit wäre, nun beim Sauerstoffverbrauch eine direkte Abhängigkeit mit der Periodenlänge zu fordern, wie es bereits bei der Aktivitätsmenge formuliert wurde. Eine andere Idee ist, dass der Sauerstoffverbrauch davon abhängt, wie gut die externe Periodenlänge mit dem  $\tau$  der Tiere unter den jeweiligen Bedingungen übereinstimmt. Eine Möglichkeit ist, dass der Sauerstoffverbrauch am niedrigsten ist, wenn die externe Periode mit dem  $\tau$  des Tieres unter diesen Bedingungen übereinstimmt. In Abbildung 41 ist dies graphisch dargestellt. Dieser Gedanke würde bedeuten, dass ein Synchronisieren auf eine andere Periodenlänge mit Kosten verbunden ist. Auf diesen Gedanken ließe sich vieles aufbauen. Beispielsweise könnte der Mitnahmebereich so erklärbar werden. Die Kosten für das Tier würden ab einem bestimmten Punkt so hoch, dass es nicht mehr synchronisiert. Ein geschwächtes oder krankes Tier hätte dann vielleicht auch einen verringerten Mitnahmebereich. Demgegenüber müssten dann auch Kosten für die Arrhythmizität gefordert werden, sonst würde es sich ja nicht lohnen, dem Zeitgeber zu folgen. Diese Kosten müssten nicht zwingend energetisch zu messen sein, sie könnten natürlich sehr verschiedener Natur sein. Die Frage war, ob die gemessenen Daten einen solchen Zusammenhang erkennen lassen würden.

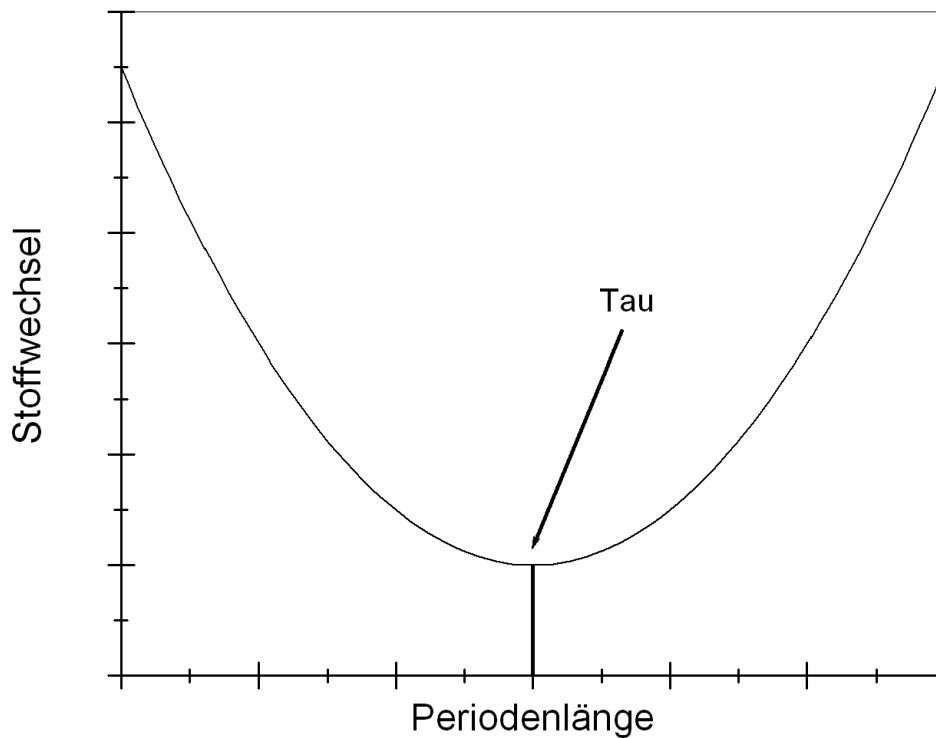


Abbildung 41: Modell wie der Sauerstoffverbrauch von der Periodenlänge abhängen könnte. Im Freilauf zeigen die Tiere ihre endogene Periodenlänge ( $\tau$ ) und hätten den niedrigsten Stoffwechsel. Andere Periodenlängen als die eigene würden nach diesem Modell zu einem höheren Sauerstoffverbrauch führen.

In den Ergebnissen (siehe 3.2.5 Sauerstoffverbrauch) sind die erhaltenen Messwerte dargestellt. Zur Veranschaulichung sollen in Abbildung 42 die Daten nochmals dargestellt werden. Der Verlauf des Sauerstoffverbrauchs bei einer direkten Abhängigkeit des Stoffwechsels von der Periodenlänge ist als zusätzlicher Graph eingefügt. Den Daten liegt die Idee zugrunde, dass etwa bei einem 19 h Tag der Sauerstoffverbrauch entsprechend  $24/19$ tel dessen beträgt, was ein Tier bei einem Zyklus von 24 h benötigt.

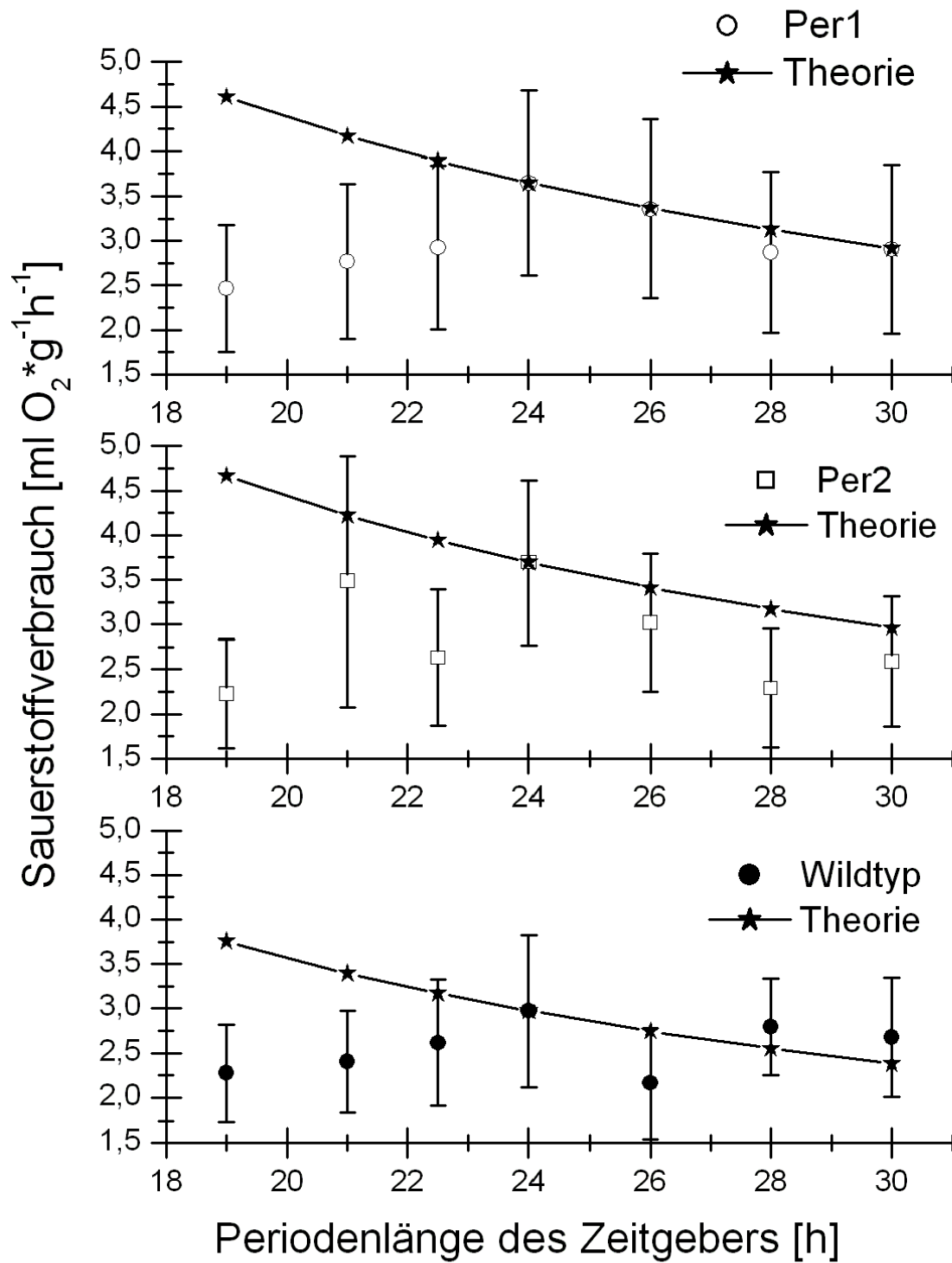


Abbildung 42: Mittlere Sauerstoffverbrauch pro 24 h Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Sterne bezeichnen den zu erwartenden Sauerstoffverbrauch bei einer direkten Abhängigkeit von der Periode des externen Zeitgebers.



Die Betrachtung der Daten kann keine der Theorien bestätigen. Es spiegelt sich nicht die erhöhte Bewegungsaktivität der Mutanten bei Periodenlängen um 24 h wider. Der mittlere Sauerstoffverbrauch der Genotypen erscheint relativ einheitlich. Keine Gruppe zeigt einen signifikant höheren oder niedrigeren Stoffwechsel. Es zeigt sich aber eine signifikante Abnahme des Stoffwechsels, besonders bei den Mutanten zu den extremen Werten hin. Dieser Effekt ist bereits bei der Aktivitätsmenge zu beobachten gewesen. Legt man die theoretischen Werte, die bei einer direkten Abhängigkeit des Stoffwechsels von der Periodenlänge zu erwarten gewesen wären, in die Graphen, so ergibt sich ein ähnliches Bild wie bereits bei den Aktivitätsdaten. Die gemessenen Werte passen lediglich zu den theoretischen und das auch nur bei Periodenlängen über 24 h. Lediglich die *Per1* Gruppe fällt auf. Bei ihnen liegen die realen Daten gut auf den berechneten. Der Strategiewechsel, hin zu fallenden Werten bei Perioden unter 24 h ist auch beim Sauerstoffverbrauch deutlich.

Die vermehrte Bewegungsaktivität scheint offenbar nicht mit einem erhöhten Energieumsatz erkauft zu werden. Weitere Klarheit bringt die Betrachtung von Abbildung 43 und Abbildung 44. Sie zeigen die Tagesprofile des Sauerstoffverbrauchs und der Bewegungsaktivität der Genotypen bei den verschiedenen Periodenlängen. Die Messungen werden bestätigt. Es findet sich kein einheitlicher Trend, der bestätigen könnte, dass erhöhte Bewegungsaktivität von vermehrtem Sauerstoffverbrauch begleitet wird. Dieses Ergebnis verwundert zunächst. Es lassen sich aber plausible Erklärungsmöglichkeiten finden. Ein Punkt ist sicher, dass der Parameter Körpertemperatur nicht mit aufgenommen werden konnte. Die Thermogenese ist enorm energieaufwändig. Eine Verringerung dieses Parameters um 1 oder 2 °C würde von außen nicht wahrzunehmen sein aber enorme Effekte auf den Energiehaushalt haben, wie die Beispiele im ersten Teil dieser Arbeit zeigen. Weitere Möglichkeiten sind Veränderungen der Temperaturverteilung im Körper der Maus. So könnte durch Vasokonstriktion die Peripherie auskühlen und die Körperkerntemperatur wäre davon unberührt. Noch weiter geht die Möglichkeit, dass die Mäuse torpid geworden sind. Hinweise darauf finden sich in der Literatur. Hudson und Scott (1978) sowie Gavrilova (1999) beschreiben Torpor bei Hausmäusen (*Mus musculus*), der im Verlauf dem des Hamsters sehr ähnlich ist. Ein weiterer Befund ist, dass durch Torpor das  $\tau$  bei Phodopus verkürzt werden kann (Thomas et al., 1993). Dieses alles lässt die Möglichkeit plausibel erscheinen, dass die Mäuse die Verringerungen im Stoffwechsel und in der Bewegungsaktivität durch Torpor erreichen könnten. Eine Durchsicht der vorhandenen Daten ergab aber keine Hinweise auf Torpor. Hinzu kommt, dass die Mäuse in den zitierten Versuchen Torpor nur bei Futtermangel und

niedrigeren Umgebungstemperaturen gezeigt hatten. Eine andere Erklärungsmöglichkeit könnte in kurzfristig, das heißt innerhalb von Tagen, möglichen Veränderungen der Enzymaktivität und Ausstattung oder einer veränderten Membranfluidität liegen. Auch diese Parameter können den Stoffwechsel stark beeinflussen. Beispielsweise diskutiert Rahmann (2000) die Beteiligung von Gangliosiden in der Zellmembran an der thermischen Adaption von Vertebraten und Cossins hat bereits 1977 Effekte der Membranfluidität bei der Temperaturakklimatisation beschreiben. Nestler et al. (2000) finden während des Torpors eine höhere Aktivität bei Enzymen, die an der Gluconeogenese beteiligt sind. Diese Beispiele zeigen, dass diese Mechanismen sehr schnell verändert werden können und entscheidenden Einfluss auf den Stoffwechsel haben können.

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Messpunkte fällt der signifikant niedrige Messpunkt der *mPer2* Tiere bei 22,5 h Periodenlänge auf. Dies ist die Zykluslänge, die bei diesen Tieren offenbar der Eigenfrequenz des verbliebenen *Per1* Oszillators entspricht. Hier zeigte diese Gruppe einheitlich auch die höchste Rhythmusstabilität. Das legt die Vermutung nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen Stabilität des Rhythmus und dem Sauerstoffverbrauch geben könnte. Dieser Gedanke erscheint logisch. Ein Tier, das einen stabilen Rhythmus zeigt, bleibt beispielsweise über mehrere Stunden ruhig liegen, um dann für einige Zeit Aktivität zu zeigen. Hierzu erhöht es die Körpertemperatur (Scherbart, 2000) und senkt sie am Ende der Aktivitätsphase wieder ab. Das erscheint wesentlich ökonomischer als das arhythmische Tier, das in viel kürzeren Intervallen zwischen Aktivität und Ruhe wechselt. Um diese Frage zu beantworten, wurden die mittleren Sauerstoffverbrauchswerte gegen die zu dieser Zeit gemessenen Daten für die Rhythmusstabilität angetragen (siehe Abbildung 35). Die Auswertung zeigte aber keinerlei Effekte der Rhythmusstabilität auf den Sauerstoffverbrauch. Damit muss die Theorie der ökonomischeren rhythmischen Mäuse verworfen werden.

Schließlich soll die oben aufgeworfene und in Abbildung 41 dargelegte These diskutiert werden, ob der Sauerstoffverbrauch von der Übereinstimmung des  $\tau$  mit der externen Periode abhängen könnte und ein Synchronisieren auf einen vom  $\tau$  verschiedenen Rhythmus umso mehr kostet, je unterschiedlicher die Zyklen sind. Die Daten des  $O_2$  Verbrauchs unter Licht-Dunkel Wechsel, wie sie hier diskutiert werden, können die These nicht bestätigen. Diese Antwort war ja bereits durch die Befunde der Mäuse unter Konstantbedingungen erwartet worden. Wenn sich bereits unter Dauerdunkel bzw. Dauerlicht kein gleichmäßig niedriger Sauerstoffverbrauch finden lässt, wie er notwendig gewesen wäre, um einen Unterschied zu den T-Zyklen erkennen zu lassen, zeichnet sich ein solches Ergebnis ab. Die Kosten für eine

Synchronisation hätten sehr deutlich ausfallen müssen, um überhaupt erkennbar gewesen zu sein. Damit es sich für das Tier „lohnt“ dem Zeitgeber zu folgen, auch wenn der eigene Rhythmus davon verschieden ist, waren auch Kosten der Arythmizität gefordert. Die Ergebnisse (Abbildung 35) zeigen aber für nicht rhythmische und damit auch nicht synchronisierte Tiere keinerlei zusätzlichen Energieaufwand an. Dieses stützt die Ablehnung der These, dass der Sauerstoffverbrauch von der Übereinstimmung von  $\tau$  und Zeitgeber abhängen könnte.

#### 4.2.5 Respiratorischer Quotient

Der respiratorische Quotient (RQ) wurde zusammen mit dem Sauerstoffverbrauch gemessen. Er gibt im wesentlichen Aufschluss über die Zusammensetzung der energieliefernden Stoffklassen. Bei reiner Kohlenhydratverbrennung ist der RQ 1,0, liegt dem Stoffwechsel Fett zugrunde, beträgt er 0,7 (Kleiber, 1967). Weiterhin kann der RQ auch Aussagen über Gewichtszunahme oder Verlust erlauben. Werden Kohlenhydrate zu Speicherfett umgebaut, steigt der RQ deutlich über eins. Umgekehrt kann er bei hungernden Tieren unter 0,7 fallen. Über den respiratorischen Quotienten in Abhängigkeit von der Periodenlänge war bislang wenig bekannt. Tsutsumi et al. (2002) finden bei Ratten einen circadianen RQ Verlauf, der der Aktivitätskurve entspricht. Experimente mit variierenden Periodenlängen unternahmen sie nicht. Die in dieser Arbeit gezeigten Befunde erlauben allerdings eine gewisse Prognose für den Verlauf des RQ. So könnte durch die vermehrte Bewegung der *Per* Mutanten bei Periodenlängen um 24 h ein erhöhter RQ zu erwarten sein. Während der Aktivitätsphase fressen die Mäuse zumeist. Die Nahrung enthält 50 % Kohlenhydrate, 19 % Protein und 4 % Fett. Die Kohlenhydrate werden zuerst verdaut, wodurch der postprandiale RQ gegen eins tendiert. Während der Ruhephase wird dann verstärkt auf Fette zugegriffen, was den RQ senkt. Es sollte sich daher im Mittel ein RQ zwischen 0,8 und 0,9 einstellen. Auswirkungen der Periodenlänge könnten durch die Arrhythmie der Tiere bei einigen Konstellationen auftreten. Diese Tiere haben u. U. einen veränderten RQ durch die nicht mehr klar zu trennenden Aktivitäts- und Ruhephasen.

Das Ergebnisse (siehe 3.2.6 Respiratorischer Quotient) lassen keine der Theorien plausibel erscheinen. Der gemessene respiratorische Quotient verläuft für alle Gruppen einheitlich. Es ist ein signifikanter Abfall der RQ mit steigender Periodenlänge zu erkennen. Der Wert bei 24 h fällt bei allen Genotypen niedriger aus. Dieser Verlauf lässt sich mit den bisher gezeigten

Parametern nicht erklären. Einige Parallelen gibt es, so haben die *mPer2* Tiere den jeweils höchsten RQ und gleichzeitig die höchste Aktivität gezeigt. Der RQ der Wildtypen ist aber nicht signifikant niedriger, obwohl der Verlauf der Aktivitätsmenge dies hätte erwarten lassen. Bei dem respiratorischen Quotienten findet sich nun tatsächlich ein direkter Zusammenhang zwischen der Periodenlänge und einem physiologischen Parameter. Dieser ist aber unter dem Hintergrund der anderen physiologischen Parameter schwierig zu erklären. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Mäuse alle unter den kurzen Perioden mehr Kohlenhydrate verdaut und Körperfett eingelagert haben. Je länger der Zyklus war, desto mehr haben sie auf ihre Fettreserven zurückgegriffen. Dieser Umstand hätte sich aber im Gewichtsverlauf zeigen sollen. Bei den routinemäßigen Kontrollen sind diese Effekte aber nicht aufgefallen. Die Betrachtung der Tagesprofile des respiratorischen Quotienten der Genotypen bei den verschiedenen Periodenlängen in Abbildung 45 und Abbildung 46 bestätigt die diskutierten Mittelwerte. Die synchronisierten Tiere zeigen das beschriebene Profil mit erhöhten RQ Werten während der Aktivität und die gemessenen Quotienten bei kurzen Perioden sind auch augenscheinlich deutlich höher. Bei genauerer Beobachtung fällt bei den kurzen Zykluslängen besonders bei der *mPer2* Gruppe die Invertierung des Tagesprofils auf. Diese deutet darauf hin, dass die Tiere durch die Verkürzung der Periodenlänge nun in der Ruhephase gefressen haben könnten. Ebenso spiegelt der Verlauf des RQ auch die Synchronisation wieder. Bei den Wildtypen findet sich unter den kurzen Perioden kein deutliches Tagesprofil mehr.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werfen mehr Fragen auf als sie beantworten. So ist der Verlauf der verschiedenen gemessenen Parameter in einigen Fällen nur schwer miteinander in Verbindung zu bringen. Das alles deutet darauf hin, dass noch weit mehr Faktoren an der Beziehung zwischen Periodenlänge und der dahinter stehenden „Mechanik“ im Tier beteiligt sein müssen.

Die Tatsache, dass bislang keine Informationen über das Verhalten der gemessenen Parameter unter variierenden Periodenlängen vorgelegen haben, lässt aber auch nicht erwarten, hier nun auf Anhieb fertige Gesetzmäßigkeiten zu finden. Vielmehr ist es ein erster Versuch Methoden und Fragestellungen zu finden, um dem Phänomen Periodenlänge auf den Grund zu gehen. Die Ergebnisse lassen die gewählten Vorgehensweisen sinnvoll erscheinen. Die Daten sind klar zu bewerten und stellen eine Grundlage für weitere Untersuchungen dar. Nun muss darauf aufgebaut werden. Die nächsten Schritte könnten beispielsweise die kontinuierliche Registrierung der Körpertemperatur und des Gewichts sowie die Ausdehnung der

Periodenlängen sein. Eine zusätzliche Richtung ist die Untersuchung von Mäusen mit Mutationen der anderen an der inneren Uhr beteiligten Gene und die Aufklärung der möglichen Veränderungen auf biochemischer Basis. Um die innere Uhr weiter zu erforschen, wäre auch ein Versuch mit einem Lichtgradienten sehr interessant. Hierbei würde den Tieren eine Abfolge von verschiedenen Helligkeiten oder auch Farben angeboten und der Aufenthaltsort in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Dieses mit der Messung des Energieumsatzes zu koppeln, verspricht, spannende Ergebnisse zu liefern. Pack mas an!

## 5 Zusammenfassung

Eine Rhythmik ist bei beinahe allen Lebewesen zu erkennen und findet ihre Entsprechung in der inneren Uhr. Damit sind Strukturen angesprochen, die selbständig eine Periodizität von etwa 24 Stunden, einen circadianen Rhythmus, generieren können. Bei Säugern ist dieser Taktgeber in den Suprachiasmatischen Nuclei (SCN) lokalisiert. Nach der derzeit gültigen Theorie wird der endogene Rhythmus durch eine Rückkopplung u.a. zwischen PER-Proteinen und *Per*-Genen im SCN generiert, die einen Oszillator bilden. Die innere Uhr wird täglich neu auf die Periode der Umgebung eingestellt (Entrainment). Das Licht ist der stärkste Zeitgeber; über eigene Sinneszellen in der Retina und separate Neurone wird die Information dem SCN zugeleitet. Der Licht-Dunkel Wechsel enthält neben der Tageszeit auch Informationen über die Jahreszeit. Diese nutzt der dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) um sich auf den Winter einzustellen, während dessen er *daily* Torpor zeigen kann. Diese Tagesschlaflathargie tritt bei den nachtaktiven Hamstern während des Tages auf und ist gekennzeichnet durch eine deutliche Verringerung des Stoffwechsels, der Körpertemperatur, der Herzfrequenz und der Bewegungsaktivität. Der erste Teil dieser Arbeit geht auf die Methodik ein, die es ermöglicht alle genannten Parameter parallel bei den Zwerghamstern zu messen. Im Vordergrund steht dabei eine, für das Tier möglichst störungsfreie Datenaufnahme über Tage bis Wochen mit Messapparaturen, die modular aufgebaut sind. Die Entwicklung von Verfahren wird geschildert und ausgesuchte Detaillösungen erläutert. An dem Beispiel eines Hamsters, der über drei Tage kontinuierlich gemessen wurde, wird das Zusammenspiel der physiologischen Parameter erarbeitet. Hierbei stehen die Effekte durch den Torpor im Vordergrund. Mit Hilfe dieser Anlage wurden im zweiten Teil der Arbeit im Gen *Per* mutierte Mäuse (*Mus musculus*) untersucht, denen ein Teil des Oszillators fehlt. Diese Tiere werden unter T-Zyklen von 19 bis 30 Stunden sowie konstanten Lichtbedingungen gehalten und dabei ihre Bewegungsaktivität und der Stoffwechsel registriert. Die Effekte, die dieses Lichtregime bei den *Per* Mäusen auslöst, werden mit denen von Wildtyp Mäusen verglichen. Die Auswirkungen auf die einzelnen Parameter werden zueinander in einen Kontext gestellt und diskutiert. Es zeigt sich, dass der respiratorische Quotient indirekt von der Periodenlänge abhängt. Die Parameter Bewegungsaktivität und Sauerstoffverbrauch erreichen bei einer Periode von 24 Stunden ihr Maximum. Dieses belegt die Bedeutung des 24 Stunden Zyklus für die Physiologie der Tiere.

Schlagnote: *Per* mutante Mäuse, Sauerstoffverbrauch, T-Zyklus Variation

**Abstract:**

Rhythms can be found in almost every animal or plant, even single cells possess an endogenous clock, which can maintain a periodicity of about 24 hours. In mammals this endogenous pacemaker is located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus. According to the latest theory these endogenous rhythm is generated by a molecular feedback loop inside the cells of the SCN. In this mechanism PER proteins and *Per* genes are involved, and together with the *Cry* Genes they form an oscillator which maintains the rhythm. This endogenous clock is re-set by the environment every day. The strongest "Zeitgeber" for this entrainment is light. The information about the light is perceived by special sensors in the retina and transferred to the SCN via the retinohypothalamic tract. The light-dark cycle carries not only information about the time of day; it also gives hints about the time of the year. This is used by the Djungarian Hamster (*Phodopus sungorus*) to prepare its physiology for the winter during which these animals can show daily torpor. This phenomenon occurs in the nocturnal hamsters during the day and it is characterized by a remarkable decrease of the metabolism, the body temperature, the heart rate and the activity.

The first part of this thesis deals with the techniques to simultaneously measure the parameters mentioned above. The main purpose was to determine the physiological data continuously over days and weeks by using equipment developed by myself and which offers a maximum amount of flexibility without disturbing the animal. The improvement of the methods is described and some features are shown in detail. Data taken from a hamster that showed torpor during three consecutive days exemplifies the interactions between the physiological parameters. In the interpretation torpor is the main issue. This equipment is also used in the second part of this thesis to investigate mice (*Mus musculus*) lacking one part of the oscillator in the SCN, namely the *Per* genes. The animals are kept under various T-cycles with durations from 19 to 30 hours while the locomotor activity and metabolism were measured. The effects of this treatment on the *Per* mutant mice are compared with wildtype mice treated the same way. The findings are discussed with respect to the different parameters. It can be shown that the respiratory quotient depends indirectly on the period length, whereas the oxygen consumption and the daily amount of activity are maximal at a period of 24 hours. These findings confirm the importance of a 24 hour rhythm for the animals' physiology.

**Key words:** *Per* mutant mice, oxygen consumption, T-cycle variation

## 6 Literatur

Albrecht, U.,  
2002, Invited review: regulation of mammalian circadian clock genes. *J Appl Physiol* 92(3):1348-55.

Arnold, W.,  
1995, Social behaviour and telemetric assesment of thermoregulation in hibernating marmots. In *Behavioural brain research in naturalistic and seminaturalistic settings*, edited by E. Alleva, et al. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Aschoff, J.,  
1960, Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Paper presented at the Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.

Aschoff, J.,  
1978a, [Circadian rhythms in man (author's transl)]. *Arzneimittelforschung* 28(10a):1820-7.

Aschoff, J.,  
1978b, [Circadian rhythms in the endocrine system (author's transl)]. *Klin Wochenschr* 56(9):425-35.

Aschoff, J., K. Hoffmann, H. Pohl and R. Wever,  
1975, Re-entrainment of circadian rhythms after phase-shifts of the Zeitgeber. *Chronobiologia* 2(1):23-78.

Bartholomew, G. A., D. Vleck and C. M. Vleck,  
1981, Instantaneous measurements of oxygen consumption during pre-flight warm-up and post-flight cooling in Sphingid and Saturniid moths. *J. exp. Biol.* 90:17-32.

Bellingham, J. and R. G. Foster,  
2002, Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res* 309(1):57-71.

Briese, E.,  
1998, Normal body temperature of rats: the setpoint controversy. *Neurosci Biobehav Rev* 22(3):427-36.

Cossins, A. R.,  
1977, Adaptation of biological membranes to temperature. The effect of temperature acclimation of goldfish upon the viscosity of synaptosomal membranes. *Biochim Biophys Acta* 470(3):395-411.

Daan, S., U. Albrecht, G. T. J. van der Horst, T. Roenneberg, T. A. Wehr and W. J. Schwartz,  
2001, Assembling a clock for all seasons: are there M and E oscillators in the genes? *Journal of Biological Rhythms* 16(2):105-116.



- Dernbach, H.,  
1997, *Winterschlaf bei Alpenmurmeltieren (Marmota marmota) im Nationalpark Berchtesgaden: Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxidproduktion und Körpertemperatur im Winterbau*. Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg.
- Dernbach, H.,  
2001, *Indirekte Kalorimetrie, berührungsfreie Aktivitätsregistrierung und telemetrische Erfassung der Herzfrequenz und der Körpertemperatur bei Kleinsäugetern*. Abschlussarbeit, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Elvert, R.,  
2001, *Kardiorespiratorische und metabolische Reaktionen während des Eintritts in den Winterschlaf beim Siebenschläfer, Glis glis*. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.
- Elvert, R. and G. Heldmaier,  
2000, Retention of Carbon Dioxide during Entrance into Torpor in Dormice. In *Life in the Cold*, edited by G. Heldmaier and M. Klingenspor, pp. 179-186. Springer Verlag, Heidelberg.
- Figala, J., K. Hoffmann and G. Goldau,  
1973, Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster *Phodopus sungorus* Pallas. *Oecologia* 12:89-118.
- Gavrilova, O., I. R. Leon, B. Marcus-Samuels, M. M. Mason, A. L. Castle, S. Refetoff, C. Vinson and M. L. Reitman,  
1999, Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms. *PNAS* 96(25):14623-14628.
- Goldman, B. D.,  
2001, Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16(4):283-301.
- Haller, J., J. Halasz, E. Mikics, M. R. Kruk and G. B. Makara,  
2000, Ultradian corticosterone rhythm and the propensity to behave aggressively in male rats. *J Neuroendocrinol* 12(10):937-40.
- Heldmaier, G.,  
1975, Metabolic and Thermoregulatory Responses to Heat and Cold in Djungarian Hamster, *Phodopus sungorus*. *J. comp. Physiol.* 102:115-122.
- Heldmaier, G. and T. Ruf,  
1992, Body temperature and metabolic rate during natural hypothermia in endotherms. *J Comp Physiol [B]* 162(8):696-706.
- Heldmaier, G. and S. Steinlechner,  
1981, Seasonal Pattern and Energetics of Short Daily Torpor in the Djungarian Hamster, *Phodopus sungorus*. *Oecologia* 48:265-270.

Heldmaier, G., S. Steinlechner, J. Rafael and P. Vsiansky,  
1981, Photoperiodic control and effects of melatonin on nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue. *Science* 212(4497):917-9.

Hering, E., R. Martin and M. Stohrer,  
1995, *Physik für Ingenieure*. VDI-Verlag, Düsseldorf.

Hoffmann, K.,  
1982, The critical photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. In *Vertebrate Circadian Systems*, edited by J. Aschoff, S. Daan and G. Groos, pp. 297-304. Springer Verlag.

Hudson, J. W. and I. M. Scott,  
1979, Daily torpor in the laboratory mouse, *mus musculus* var. albino. *Physiol. Zool.* 52:205-218.

Jensen, D. R., E. C. Gayles, S. Ammon, R. Phillips and R. H. Eckel,  
2001, A self-correcting indirect calorimeter system for the measurement of energy balance in small animals. *J Appl Physiol* 90(3):912-8.

Kauffman, A. S., A. Cabrera and I. Zucker,  
2001, Torpor characteristics and energy requirements of furless Siberian hamsters. *Physiol Biochem Zool* 74(6):876-84.

Kern, W., S. Offenheuser, J. Born and H. L. Fehm,  
1996, Entrainment of ultradian oscillations in the secretion of insulin and glucagon to the nonrapid eye movement/rapid eye movement sleep rhythm in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81(4):1541-7.

Klante, G. and S. Steinlechner,  
1995, A short red light pulse during dark phase of LD-cycle perturbs the hamster's circadian clock. *J Comp Physiol [A]* 177(6):775-80.

Kleiber, M.,  
1967, *Der Energiehaushalt von Mensch und Haustier*. Verlag Paul Parey.

Kramer, K., L. Kinter, B. P. Brockway, H. P. Voss, R. Remie and B. L. Van Zutphen,  
2001, The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. *Contemp Top Lab Anim Sci* 40(1):8-16.

Malan, A., A. H. and A. Waechter ,  
1973, Pulmonary respiration and acid- base state in hibernating marmots and hamsters. *Respiration Physiology* 17:45-61.

Moore, R. Y. and V. B. Eichler,  
1972, Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research* 42:201-206.

Mrosovsky, N.,  
1999, Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiol Int* 16(4):415-29.

- Mrosovsky, N., P. A. Salmon, M. Menaker and M. R. Ralph,  
1992, Nonphotic phase shifting in hamster clock mutants. *J Biol Rhythms* 7(1):41-9.
- Nestler, J. R.,  
1990, Relationships between respiratory quotient and metabolic rate during entry to and arousal from daily torpor in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Physiol Zool*, 63:504-515.
- Neumann, D.,  
1989, Circadian components of semilunar and lunar timing mechanisms. *J Biol Rhythms* 4(2):285-94.
- Oklejewicz, M., R. A. Hut and S. Daan,  
2000, Effect of deuterium on the circadian period and metabolism in wild-type and tau mutant Syrian hamsters. *Physiol Behav* 71(1-2):69-74.
- Oklejewicz, M., R. A. Hut, S. Daan, A. S. Loudon and A. J. Stirling,  
1997, Metabolic rate changes proportionally to circadian frequency in tau mutant Syrian hamsters. *J Biol Rhythms* 12(5):413-22.
- Ortmann, S.,  
1997, *Strategien der saisonalen Anpassung beim Alpenmurmeltier (Marmota marmota)*. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.
- Oster, H., A. Yasui, G. T. J. van der Horst and U. Albrecht,  
2002, Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice. *Genes & Development* 16:2633-2638.
- Pittendrigh, C. S.,  
1960, Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. Paper presented at the Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.
- Plonait, H. and D. Buttner,  
1984, Electrocardiogram and temperature telemetry equipment for use in laboratory animals permitting long time measurement and improved noise suppression. *Biomed Tech (Berl)* 29(1-2):13-8.
- Puchalski, W.,  
1984, *Kardiovaskuläre und hämatologische Aspekte der Anpassung des Sauerstoffverbrauchs an jahreszeitlich wechselnde Stoffwechselleistungen von Phodopus sungorus (Pallas)*. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.
- Rahmann, H.,  
2000, Physico-chemical Model for Brain Ganglioside Function in Thermal Adaption of Vertebrates. In *Life in the cold*, edited by G. Heldmaier and M. Klingspor, pp. 519-526. Springer, Heidelberg.
- Ralph, M. R. and M. Menaker,  
1988, A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241(4870):1225-7.

Refinetti, R. and M. Menaker,  
1997, Is energy expenditure in the hamster primarily under homeostatic or circadian control? *J Physiol* 501(Pt 2):449-53.

Reppert, S. M. and D. R. Weaver,  
2002, Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901):935-41.

Roenneberg, T. and M. Mellow,  
2001, The circadian systems of cells. In *Biological Rhythms*, edited by V. Kumar. Narosa Publishing House, New Dehli.

Ruf, T.,  
1991, *Torpor beim dsungarischen Zwerghamster (Phodopus sungorus) und der Hirschmaus (Peromyscus maniculatus): Saisonalität, Tagseperiodik und Energetik*. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.

Ruf, T. and G. Heldmaier,  
1987, Computerized body temperature telemetry in small animals: use of simple equipment and advanced noise suppression. *Comput Biol Med* 17(5):331-40.

Scherbarth, F.,  
2000, *Warmlaufen oder warm laufen?* Diplomarbeit,, Tierärztliche Hochschule, Hannover.

Schmidt, R. F. and G. Thews,  
1995, *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin.

Shirakawa, T., S. Honma and K. Honma,  
2001, Multiple oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int* 18(3):371-387.

Sokolove, P. G. and W. N. Bushell,  
1978, The chi square periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol* 72:131-160.

Steinlechner, S., A. Buchberger and G. Heldmaier,  
1987, Circadian rhythms of pineal N-acetyltransferase activity in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*, in response to seasonal changes of natural photoperiod. *J Comp Physiol [A]* 160(5):593-7.

Steinlechner, S., B. Jacobmeier, F. Scherbarth, H. Dernbach, F. Kruse and U. Albrecht,  
2002b, Robust circadian rhythmicity of *Per1* and *Per2* mutant mice in constant light, and dynamics of *Per1* and *Per2* gene expression under long and short photoperiods. *J Biol Rhythms* 17(3):202-209.

Steinlechner, S., A. Stieglitz and T. Ruf,  
2002a, Djungarian hamsters: a species with a labile circadian pacemaker? Arrhythmicity under a light-dark cycle induced by short light pulses. *J Biol Rhythms* 17(3):248-258.

Thomas, E. M., M. E. Jewett and I. Zucker,  
1993, Torpor shortens the period of Siberian hamster circadian rhythms. *Am J Physiol* 265(4 Pt 2):R951-6.

Tsutsumi, K., Y. Inoue and Y. Kondo,  
2002, The relationship between lipoprotein lipase activity and respiratory quotient of rats in circadian rhythms. *Biol Pharm Bull* 25(10):1360-3.

Zar, J. H.,  
1999, *Biostatistical analysis*. Prentice- Hall Inc.

## **7 Anhang**

### 7.1 Zeitauflösende Darstellung der gemessenen Parameter

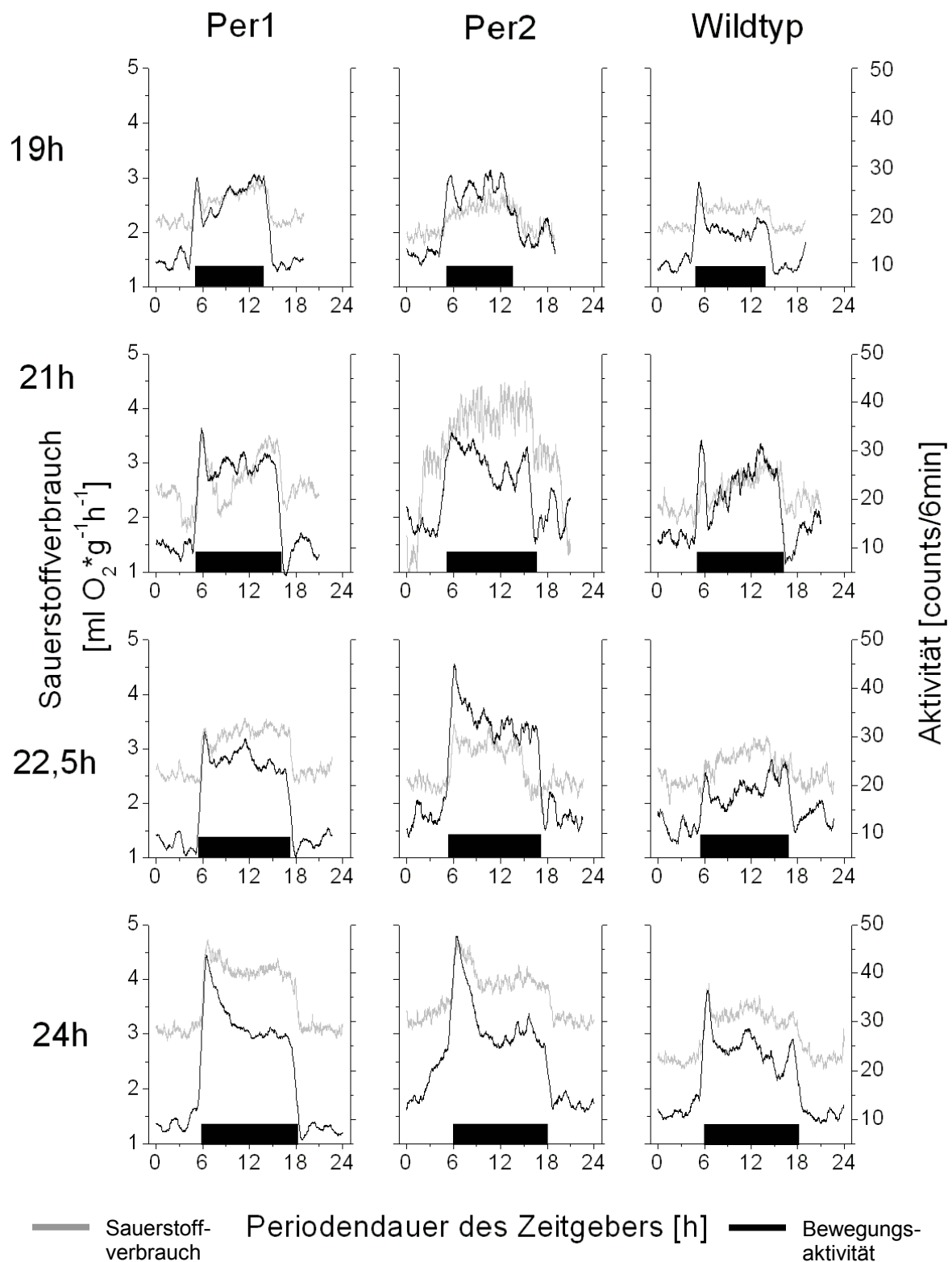


Abbildung 43: Sauerstoffverbrauch und Bewegungsaktivität der drei Genotypen von 19 bis 24 Stunden

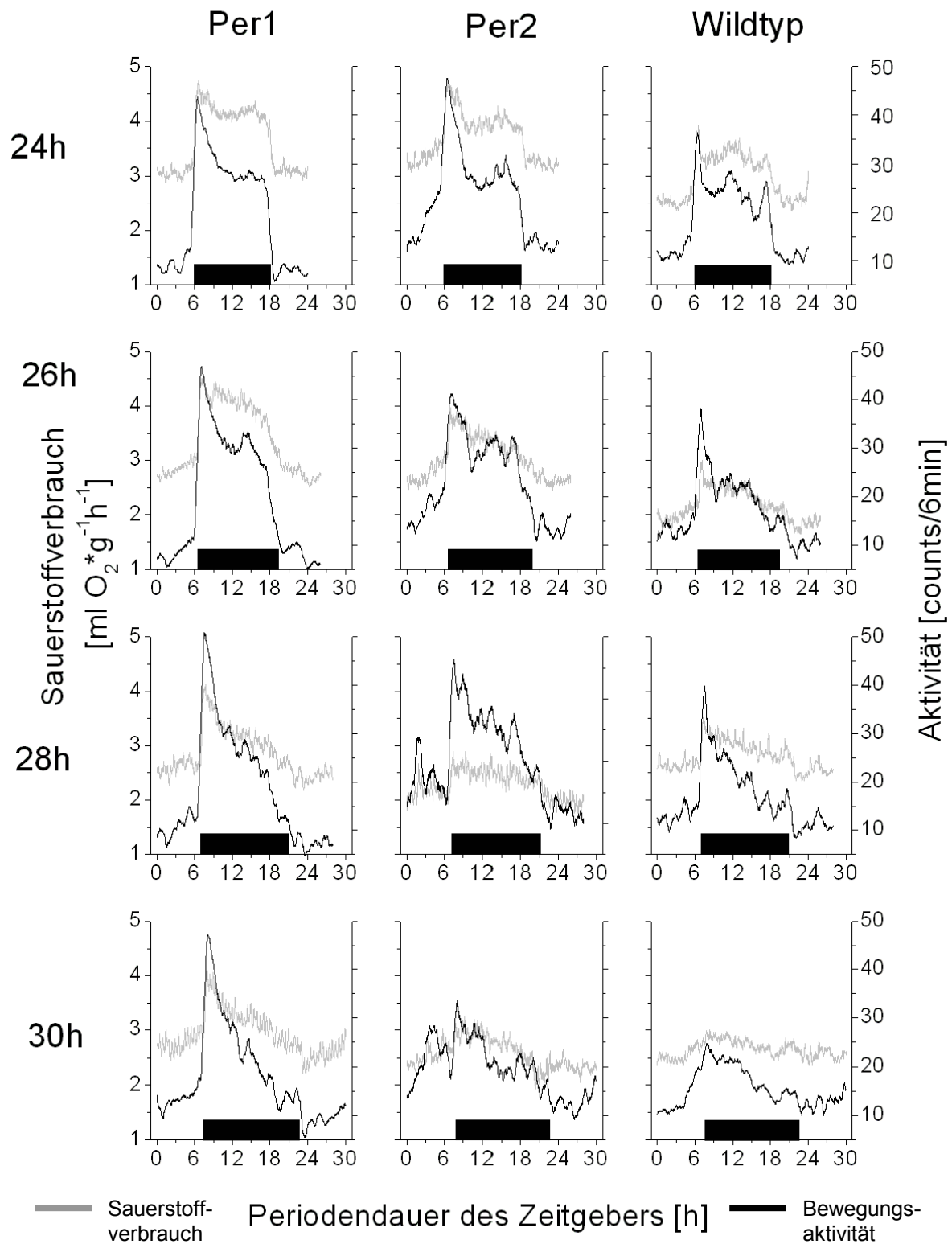


Abbildung 44: Sauerstoffverbrauch und Bewegungsaktivität der drei Genotypen von 24 bis 30 Stunden



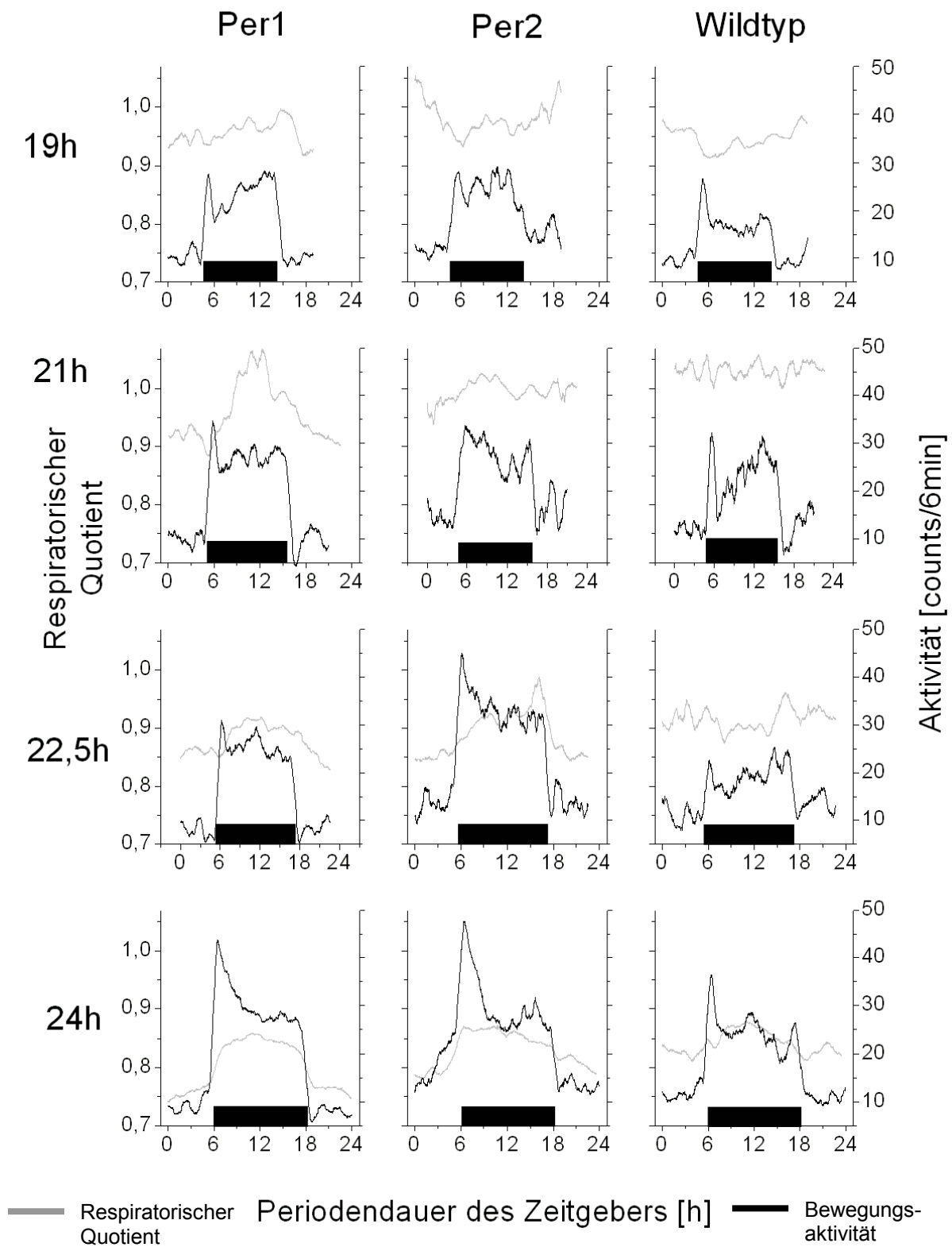


Abbildung 45: Respiratorischer Quotient und Bewegungsaktivität der drei Genotypen von 19 bis 24 Stunden.

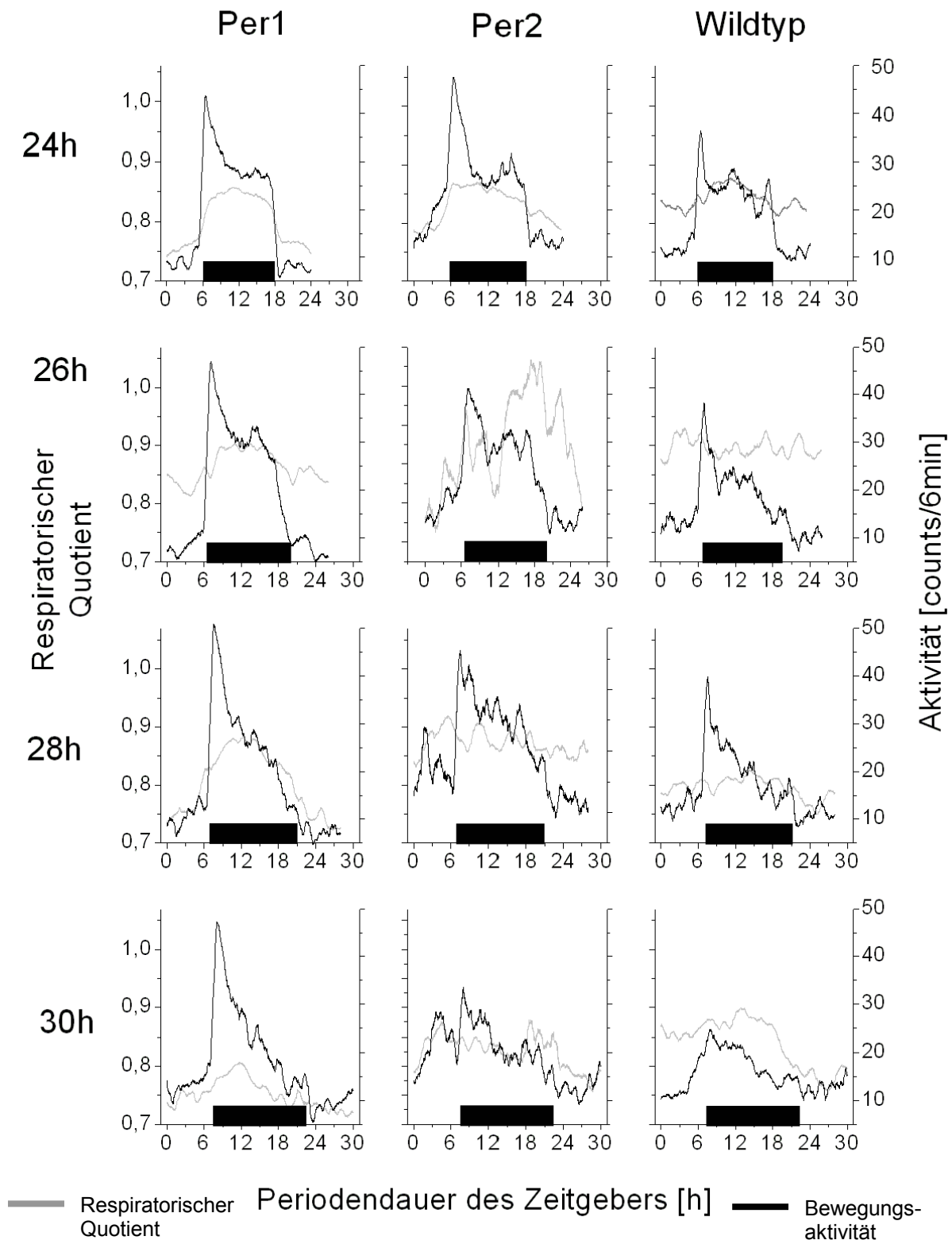


Abbildung 46: Respiratorischer Quotient und Bewegungsaktivität der drei Genotypen von 24 bis 30 Stunden.

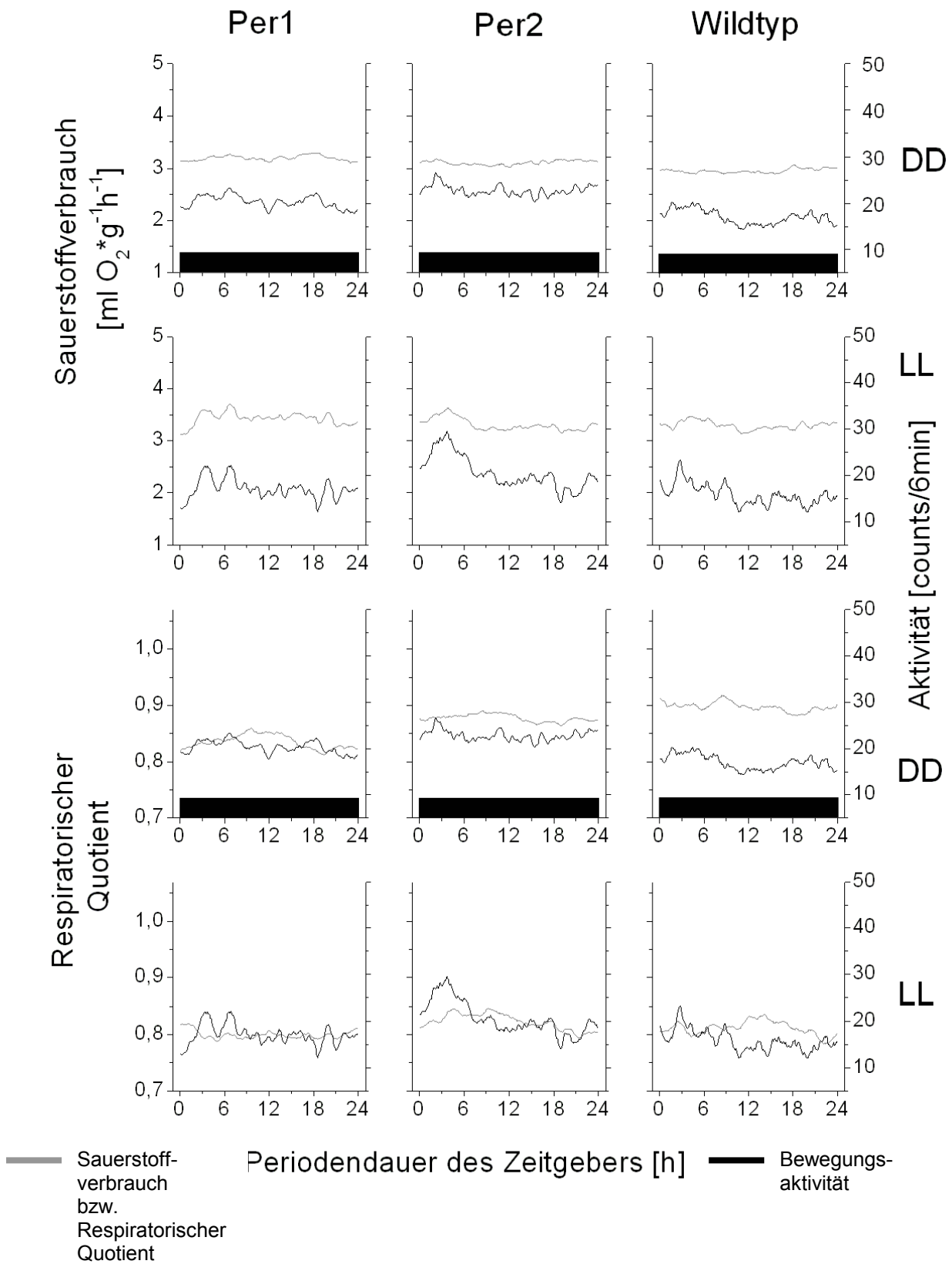


Abbildung 47: Sauerstoffverbrauch, Respiratorischer Quotient und Bewegungsaktivität der drei Genotypen unter konstanten Lichtbedingungen.

## 7.2 Komponenten und Adressen

Komponente	Beschreibung	Bezugsquelle
A/D-Karte für Körpertemperaturregistrierung	16 Kanal 12 Bit AD/DA Wandler	Conrad Electronic Goseriede 3 30159 Hannover Tel: 0511/126087-0 Fax: 0511/121697-14 <a href="http://www.conrad.de">http://www.conrad.de</a>
A/D-Karte für Flussmesser	CIO-DAS08 8 Kanal 12 bit 20kHz	Plug-in Electronic GmbH Postfach 345 82219 Eichenau Tel.: 08141/3697-0 Fax: 08141/3697-30 <a href="http://www.plug-in.de">http://www.plug-in.de</a>
Analysator für Atemgase	Multor 610 1 Kanal NDIR + O <sub>2</sub> Gasanalysator	Maihak AG Bettenhäuser Str.24 34266 Niestetal/Kassel Tel.: 0561/526800 Fax: 0561/524699
Anschlussnippel	Bosch Katalog 10.136 22 x 1/8 Zoll Gewinde 16 x 1/4 Zoll Gewinde 10 x M5 Gewinde 5 x M5 Stopfen 1 x 9 fach T Verteiler	PTS Marquardt GmbH & Co. Pneumatik - Technik - Steuerungen Donatusstraße 166 50259 Pulheim Tel.: 02234/98406-0 Fax 02234/81377
Bewegungsmelder	Passiver IR Sensor 5 VDC, 1mA	Conrad Electronic
Datenacquisitionsprogramm	Chart Version 3.5	ADInstruments Pty Ltd. Castle Hill Australia
Datenerfassungshardware	PowerLab/4	ADInstruments, Pty Ltd.

<b>Komponente</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Eichgasmischpumpe	Gasmischpumpe Typ SA 27 2F	H. Wösthoff Meßtechnik GmbH Postfach 102747 44727 Bochum Tel.: 0234/518-14/-15 Fax: 0234/583393
Empfänger für Herzratensender	Receiver, Type: RPC-1	Data Sciences International St. Paul, Minnesota, USA <a href="http://www.dsi.com/">http://www.dsi.com/</a>
Flussanzeiger	Schwebkörper- Kleindurchflussmesser Brooks-Mite PT 2700 316SS Schwimmer für 156 l/h	Brooks Instrument GmbH Haan Office Rheinische Straße 2 42781 Haan Tel.: 02129/553-151 Fax: 02129/553-152
Flussmesser	Durchflusssensoren Honeywell AWM 3300V 0 - 60 l/min, 1 – 5 V	Farnell Electronic Components GmbH Grünwalder Weg 30 82041 Deisenhofen
Gas-Trocknung	Elektro-Gaskühler ECP1000-G 150 l/h (50 ml Totvolumen des kommerziellen Wärmetauschers)	M&C Products Analysentechnik GmbH Rehecke 79 40885 Ratingen Tel.: 02102/935-0 Fax: 02102/935-111 <a href="http://www.muc-products.de">http://www.muc-products.de</a>
Herzfrequenzsender	Transmitter (Type: ETA-F20)	Data Sciences International
I/O Karte	PC Schaltinterface 48 Ports 8255-I/O-Karte	Conrad Electronic
Käfige	Plastik Aquarien 261 x 160 x 172 mm	Rebie Paulusstraße 43 33602 Bielefeld
Körpertemperatur- sender	Minimitter Serie 3000 XM FH 1,2 g	Mini-Mitter Co., Inc. P.O. Box 3386 Sunriver, OR 97707, USA Telephone: 541-593-8639 Fax: 541-593-5604 <a href="http://www.minimitter.com/">http://www.minimitter.com/</a>

Komponente	Beschreibung	Bezugsquelle
Küvettenpumpe	60 l/h max. 150 l/h Schege Membranpumpe TRS 70 0010 220VAC	Schege Schemel&Goetz GmbH&Co.KG Schreberstr. 14 63069 Offenbach Tel.: 069/835748 Fax: 069/847181
Licht-Spannungs- Wandler	TSL 250 Licht-Spannungswandler Best. Nr. 163970-62	Conrad Electronic
Massenflussmesser	MKS Durchflussmonitor Typ 0358C-01000SVS008 Typ 0358C-20000SVS008 0,5% Auflösung 60 l/h und 600 l/h	MKS Instruments Deutschland GmbH Schatzbogen 43 81829 München Tel.: 089/420008-0 Fax: 089/424108
Multiplex- Erweiterungskarte	CIO-EXP32/16 Erweitert auf 32 Kanäle	Plug-in Electronic GmbH
Oliven	4 mm gerade H50173 4 mm Y-Stück H50176 Polypropylen	Novodirekt Postfach 1466 77674 Kehl/Rhein Tel.: 07851/7069 Fax: 07851/75362 <a href="http://www.bioblock.de">http://www.bioblock.de</a>
Acrylglasdeckel und Halterungen	Für 3er Macrolonkäfige mit und ohne Laufrad	Joachim Besa Kunststoffe GmbH Eichelkampstraße 30 Hannover Tel.: 0511/871535 Fax: 0511/868995
Radios	UKW/MW-Radio UT-204 Mittelwellen-Empfänger mit Kopfhörerausgang	Conrad Electronic
Relaiskarte	Centronics Interface 8 Kanal für PC	Conrad Electronic
Schläuche	4 mm Innendurchmesser 0,8 mm Wandstärke Tygon R3603 H71108	Novodirekt

Komponente	Beschreibung	Bezugsquelle
Schlauchklemmen	20 mm 9.180120 Messing vernickelt	H.Jürgens&Co.-GmbH&Co. Elbingerröder Str. 1 Gehrden Tel.: 05108/91670
Software für selbstimplementierte Programme	QuickBasic 7.0	Microsoft Seattle, USA
Stromversorgung MFM	Festspannungsnetzteil mit Trafo für symmetrische $\pm 15$ V Best Nr. 199532-66 Max 200 mA $\pm 15$ VDC	Conrad Electronic
Trockenmittel	Silica Gel, Blaugel 1-3 mm, 720-770g/l 20% Wasseraufnahme Reg. 120-175°C 2 kg Best.Nr. 9351.1	Carl Roth GmbH & Co. Schoemperlenstraße 1-5 76185 Karlsruhe Tel.: 0721/56060 Fax: 0721/5606149 Best.: 0130/5699 <a href="http://www.carl-roth.de">http://www.carl-roth.de</a>
Ventile	3/2 Wege Magnetventil Typ 0330 Wirkw. E 4 mm Nennweite Mit Verschraubung 780094W 4 mm 12VDC mit 1/4 Zoll Nippeln	Bürkert GmbH & Co.KG Rendsburger Str. 12 30659 Hannover Tel.: 0511/902760 Fax: 0511/9027666
Vergleichgaspumpe	NF30KNDC Membranpumpe 6 VDC 90 l/h	KNF Neuberger GmbH Alter Weg 3 79112 Freiburg-Munzingen Tel.:7664 5909 0 Fax:7664 2124 <a href="http://www.knf.com">http://www.knf.com</a> E-mail: knf@rol3.de
Waage	EW 6000-1M Elektronische Laborwaage mit RS 232 Schnittstelle 6000 g /0.1 g	Kern & Sohn GmbH D-72421 Albstadt-Ebingen Tel.: 07431/9389-0 <a href="http://www.kern-sohn.de">www.kern-sohn.de</a>

## **L e b e n s l a u f**

### *Persönliche Daten*

Name	Dernbach
Vorname	Haiko
Anschrift	Freitagstraße 26, 30169 Hannover
Geboren	08. Juni 1970 in München
Familienstand	verheiratet
Nationalität	deutsch

### *Schulische Ausbildung*

1976 - 1978	Grund- und Hauptschule Oberammergau
1978 - 1981	Grund- und Hauptschule Coburg
1981 - 1990	Gymnasium Ernestinum Coburg
Juni 1990	Schulabschluss: Abitur

### *Zivildienst*

September 1990- November 1991	Zivildienst beim Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland in Coburg
----------------------------------	---

### *Studium*

Oktober 1991	Biologiestudium an der Philipps-Universität Marburg
Juli 1993	Vordiplom
Juni 1996	Diplomarbeit in der Tierphysiologie (Zoologie)
Juli 1997	Studienabschluss: Diplom-Biologe
Seit Januar 1998	Promotionsstudium an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
1999 bis 2001	Aufbaustudium Biomedizinische Technik

### *Praktische Tätigkeiten*

Mai 1994 - Juli 1997	Teilnahme am Forschungsprojekt Murmeltiere im National- park Berchtesgaden mit Schwerpunkten Telemetrie, Sauerstoffverbrauch und Temperaturmessung
Seit Januar 1998	Erstellung von Aufbauten zur Messung physiologischer Parameter bei Kleinsäugetern einschließlich der Software Betreuung von Praktika im Rahmen des Biologie- und Veterinärmedizinstudiums.



## **Danksagung:**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle steht hier zweifellos Stephan Steinlechner. Seine Tür war immer offen und ich konnte mich jederzeit mit fachlichen und auch darüber hinausgehenden Fragen an ihn wenden und bekam auch immer gute Anregungen mit auf den Weg. Bei meinen Basteleien hat er mir stets freie Hand gelassen und mich meine Ideen umsetzen lassen, auch wenn er vielleicht manchmal erst im Nachhinein von meinem Tun überzeugt war, was mir sein Vertrauen bewiesen hat.

Thomas Ruf hatte jederzeit ein offenes Ohr, wenn es um Ideen für Versuche, Interpretation von Daten oder gar Fragen zur Statistik ging und überraschte jedes Mal mit seinen Lösungsvorschlägen.

Oliver Stiedl hat die Herzfrequenzmessungen erst möglich gemacht und auch bei der Fertigung des Kondensationskühlers einen entscheidenden Anteil gehabt. Darüber hinaus verbindet uns ein gemeinsames Interesse am „tierphysiologischen Basteln“, aus dem ein reger Ideenaustausch resultierte.

Urs Albrecht hat die *Per* Mäuse zur Verfügung gestellt. Die Tiere stellen einen idealen Modellorganismus für meine Fragestellung dar und die Versuche wären in dieser Form ohne sie gar nicht möglich gewesen.

Robert Dallmann war stets ein guter Diskussionspartner und hatte oft Ideen, die einen wieder etwas weiter gebracht haben, wenn man mal in einer gedanklichen Sackgasse war.

Und schließlich möchte ich Insa nennen, die mich mit viel Geduld und Wärme nach Kräften unterstützt hat, während ich rumgedoktort habe. Ihr gilt mein besonderer Dank!